

^{60}Co - γ -Bestrahlung von fester DNA und
isolierten Zellkernen aus Hühnererythrozyten

Dissertation
zur Erlangung des Grades Dr.rer.nat.
der Abteilung für Chemie
an der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von
Ingeborg Krönke
aus Frankfurt a. Main

1983

$^{60}\text{Co}-\gamma$ -Bestrahlung von fester DNA und
isolierten Zellkernen aus Hühnererythrozyten

Dissertation
zur Erlangung des Grades Dr. rer. nat.
der Abteilung für Chemie
an der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von
Ingeborg Krönke
aus Frankfurt a. Main

1983



Referent: Prof. Dr. D. Schulte-Frohlinde

Korreferent: Prof. Dr. O. Pongs

Tag der mündlichen Prüfung: 10. Februar 1983

Diese Arbeit entstand in der Zeit vom April 1980 bis Dezember 1982 im Max-Planck-Institut für Strahlenchemie, Mülheim a. d. Ruhr, unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. D. Schulte-Frohlinde.

Herrn Prof. Dr. D. Schulte-Frohlinde möchte ich für die Themenstellung und das fördernde Interesse danken, das er meiner Arbeit entgegenbrachte.

Besonders danke ich auch Herrn Prof. Dr. C. von Sonntag für die wertvollen Anregungen und Diskussionen zu der Arbeit.

Mein Dank gilt ebenso Frau U. Rauhut für die Aufnahme der Gaschromatogramme.

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

I	E I N L E I T U N G	1
1.1.	Allgemeine Einführung	1
1.2.	Strahlenchemie des Wassers	2
1.3.	Strahlenchemie der DNA	5
II	Z I E L D E R A R B E I T	22
III	E R G E B N I S S E	24
3.1.	Baseneliminierung	24
3.1.1.	Analytik der Bestrahlungsprodukte	24
3.1.2.	γ -Bestrahlung von Kalbsthymus- DNA	27
3.1.2.1.	Dosisabhängigkeit	32
3.1.3.	Bestrahlung von Zellkernen aus Hühnererythrozyten	37
3.1.3.1.	Isolierung von Zellkernen	37
3.1.3.2.	Bestrahlung von Zellkernen und Dosis- abhängigkeit	38
3.2.	Isolierung veränderter Zucker und Zucker- endgruppen aus γ -bestrahlter DNA	42
3.2.1.	Bestrahlung von Kalbsthymus- DNA und Analyse der veränderten Zucker und alkalilabiler Stellen	42
3.2.1.1.	Dosiseffekte	47
3.2.1.2.	Identifizierung der Bestrahlungsprodukte durch GC-MS	53
3.2.2.	Bestimmung des molekularen Wasserstoffs	61

3.3.	Molekulargewichtsbestimmung	62
3.4.	2-Thiobarbitursäure- Test auf Bestrahlungsprodukte	67
3.4.1.	Dosiseffekte	69
3.4.2.	Dünnschichtchromatographie	75
3.4.3.	Säulenchromatographie an Sephadex A 25	75
3.4.4.	Gelchromatographie an Sephadex G 10	76
3.4.5.	Hydrolyse der Bestrahlungsprodukte und Sedimentation	77
3.4.6.	Kinetik der Bestrahlungsprodukte für die Reaktion mit 2-Thiobarbitursäure	81
IV	D I S K U S S I O N	83
4.1.	Basenabspaltung bei der γ -Bestrahlung von DNA	83
4.2.	Basenabspaltung bei bestrahlten Zellkernen	89
4.3.	Bildung veränderter Zucker bei der Be- strahlung von DNA	92
4.4.	Reaktion der Bestrahlungsprodukte mit 2-Thiobarbitursäure	94
V	E X P E R I M E N T E L L E R T E I L	100
5.1.	Substanzen	100
5.1.1.	Käufliche Substanzen	100
5.1.2.	Reinigung der Verbindungen	101
5.1.3.	Zellkerne	101
5.1.3.1.	Isolierung von Zellkernen	102

5.2.	Strahlenquelle und Dosimetrie	103
5.2.1.	Bestrahlung der DNA	104
5.2.2.	Bestrahlung der Zellkerne	105
5.3.	Lysis der bestrahlten Zellkerne	106
5.4.	Analytik zur Baseneliminierung	106
5.4.1.	Säulenchromatographie an DEAE-Sephadex A 25	106
5.4.2.	Hochdruckflüssigkeitschromatographie	107
5.5.	Analyse der veränderten Zucker und Zuckerendgruppen	108
5.5.1.	Reduktion	108
5.5.2.	Alkalische Hydrolyse	109
5.5.3.	Inkubation mit alkalischer Phosphatase	109
5.5.4.	Gaschromatographie	109
5.6.	Streulichtmessung	111
5.7.	Reaktion mit 2-Thiobarbitursäure	111
5.7.1.	Säulenchromatographie an Sephadex G 10	112
5.7.2.	Dünnschichtchromatographie	113
5.7.3.	Fällungen mit Ethanol	113
VI	Z U S A M M E N F A S S U N G	114
VII	A N H A N G	117
VIII	L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S	129

Gedruckt im
Max-Planck-Institut für Strahlenchemie
D-4330 Mülheim a. d. Ruhr

1983

I EINLEITUNG

1.1. Allgemeine Einführung

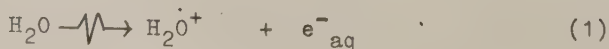
Als Träger der genetischen Information kommt der Desoxyribonukleinsäure (DNA) in einer lebenden Zelle eine besondere Bedeutung zu. Die in den Zellkernen enthaltene DNA überträgt alle für ein Individuum charakteristischen Merkmale auf den bei der Fortpflanzung entstehenden Organismus. Setzt man Zellen ionisierender Strahlung aus, so kann die molekulare Struktur der DNA so stark geschädigt werden, daß Mutationen oder Chromosomenaberrationen entstehen, die Zellen in ihrer Vermehrungsfähigkeit gehemmt werden oder die Bestrahlung sogar zum Zelltod führen ¹. Wegen ihrer bacteriziden Wirkung werden die energiereichen Strahlen z.B. zur Sterilisation von Verpackungsmaterialien angewandt ². Die Konservierung von Lebensmitteln durch ionisierende Strahlen ist in unserem Land noch nicht zugelassen, da die endgültige Beurteilung hinsichtlich der Unbedenklichkeit noch aussteht ³. Auch im medizinischen Bereich ist die Anwendbarkeit der ionisierenden Strahlen beim Menschen noch nicht vollständig geklärt, sodaß es notwendig ist, die biologische Strahlenwirkung näher zu erforschen.

Wenn man Zellen einer Bestrahlung aussetzt, muß man mit einem direkten und einem indirekten Effekt der

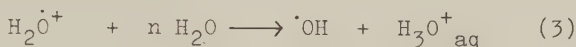
Strahlung auf die DNA- Moleküle rechnen. Beim indirekten Effekt wird die Strahlung zunächst vom umgebenden Wasser absorbiert, und die Radiolyseprodukte des Wassers sowie sekundäre organische Moleküle ⁴ reagieren dann mit der DNA. Der direkte Effekt kommt dadurch zustande, daß die Energie der ionisierenden Strahlung vom DNA- Molekül selbst absorbiert und dadurch Veränderungen hervorgerufen werden. Michaels und Hunt ⁵ schreiben dem direkten Effekt 45% der DNA- Schädigung zu, neuerdings gehen aber die Überlegungen dahin, daß dieser Anteil wesentlich höher einzuschätzen ist. Daher spielen Veränderungen an der DNA durch den direkten Effekt eine entscheidende Rolle und können die genetische Information in der Zelle beeinträchtigen. Da eine Zelle zum größten Teil aus Wasser besteht, können auch die Radiolyseprodukte des Wassers DNA- Schäden verursachen. Im folgenden wird daher zunächst auf die Radiolyse des Wassers eingegangen.

1.2. Strahlenchemie des Wassers

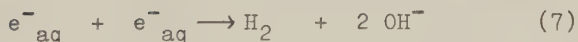
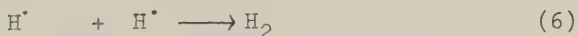
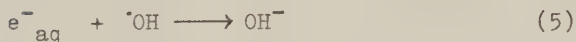
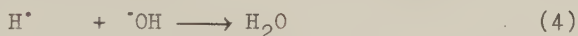
Die ionisierende Strahlung, die vom Wasser absorbiert wird, verliert ihre Energie durch Ionisation oder Anregung. Als Primärprodukte werden dabei folgende reaktionsfähige Spezies gebildet ^{6, 7}



Das nach Reaktion (1) gebildete Wasserradikalkation reagiert sofort mit benachbarten Wassermolekeln nach Gleichung (3) weiter zu Hydroniumionen und OH- Radikalen:



Nach Reaktion (2) entstehen elektronisch angeregte Wassermoleküle, die in H- und OH- Radikale zerfallen können. Die reaktiven Spezies können aus den Bahnen der Strahlung, in denen sie erzeugt werden, den sogenannten Spurs diffundieren und miteinander reagieren, z.B. ^{8,9}



Zur Bestimmung der Ausbeuten der primären radikalischen Produkte werden Radikalfänger in geringen Konzentrationen zugesetzt. Aus der Konzentration der umgesetzten Produkte läßt sich dann die Ausbeute an Primärradikalen, bezogen auf 100 eV absorbierter Energie berechnen. Diese Ausbeute,

die Zahl der veränderten Molekeln pro 100 eV absorbiertener Energie, bezeichnet man als G-Wert. Nach den Reaktionen (6), (7) und (8) entstehen Wasserstoff und Wasserstoffperoxid, die sogenannten molekularen Produkte. Die G-Werte für die Radiolyseprodukte des Wassers geben die Anteile der Primärteilchen wieder, die der Abreaktion in den "Spurs" entkommen sind. Sie betragen für dünnionisierende Strahlung (γ -, Röntgen- und Elektronenstrahlen) ^{6,10} :

$$G(e^-_{aq}) = 2,7$$

$$G(H_3O^+) = 2,7$$

$$G(\dot{H}) = 0,55$$

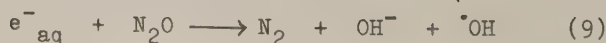
$$G(OH^-) = 0,2$$

$$G(\dot{OH}) = 2,7$$

$$G(H_2) = 0,45$$

$$G(H_2O_2) = 0,7$$

Bei der Bestrahlung entstehen gleichzeitig oxidierende ($\dot{OH}$) und reduzierende Teilchen ($\dot{H}$ und e^-_{aq}). Mit Hilfe spezieller Radikalfänger kann man aber eine Art von Teilchen unterdrücken oder umwandeln. So werden z.B. durch Sättigung von Wasser mit N_2O nach (9) weitere OH^- Radikale gebildet. Auf diese Weise kann man Produkte, die über das OH^- Radikal gebildet werden, mit größeren Ausbeuten erhalten:



Der G-Wert beträgt dann $G(\dot{\text{O}}\text{H}) = 5,4$ in verdünnten Lösungen und steigt bei hohen Substratkonzentrationen nach Schuler et al. ¹¹ bis auf maximal 6,0 an.

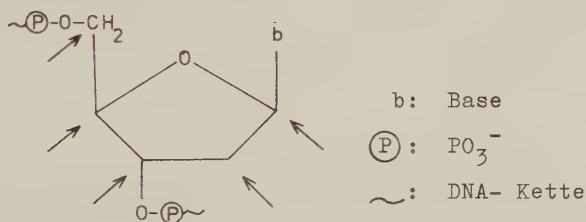
1.3. Strahlenchemie der DNA

Eine Reihe von Autoren haben sich mit dem Einfluß ionisierender Strahlung auf Untereinheiten der DNA wie Basen, 2-Desoxyribose, Nukleosiden und Nukleotiden beschäftigt. Eine Übersicht geben die Autoren in "Effects of Ionizing Radiation on DNA" ¹². Um strahlen-induzierte Veränderungen in der Zelle mit ihrer Vielzahl von Komponenten besser verstehen zu können, dienten diese Substanzen als Modellsysteme. Der Einfluß der durch die Radiolyse des Wassers gebildeten reaktiven Spezies (OH^- Radikale, H^- Atome und solvatisierten Elektronen) auf Basen, Nukleoside und Nukleotide ist untersucht worden. Pyrimidinbasen werden bevorzugt an der $\text{C}_5\text{-C}_6$ - Doppelbindung angegriffen. Es sind Bestrahlungsprodukte aus Thymin ¹³, Adenin ¹⁴ und Cytosin ¹⁵ identifiziert worden. Ward ¹⁶ informiert in einem Übersichtsartikel über die Bestrahlungsprodukte aus den Basen enthaltenden DNA- Komponenten (Basen, Nukleosiden und Nukleotiden). Auf diese Basenveränderungen wird im folgenden nicht näher eingegangen.

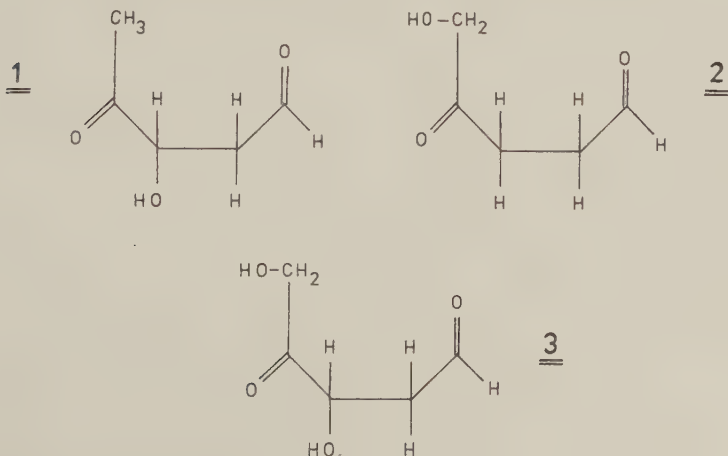
Von den strahlenchemischen Veränderungen, die bei der γ -Bestrahlung der DNA auftreten, sind u.a. neben Basenschäden besonders die Brüche in der Doppelhelix der DNA untersucht worden. Solche Brüche können an einem einzelnen Strang (Einzelstrangbruch) oder an beiden Strängen gleichzeitig (Doppelstrangbruch) auftreten. Die DNA in wässriger Lösung dient als Modellsystem, um Strahlenschäden in einer Zelle aufzuklären. Die Doppelstrangbrüche sind hierbei nach Leenhouts und Chadwick ¹⁷ als besonders schwere Strahlenschäden anzusehen, weil bei jedem Doppelstrangbruch letale Folgen möglich sind. Gelegentlich können auch Einzelstrangbrüche zu irreparablen Schäden in der Zelle führen. Von den reaktiven Spezies der Wasserradiolyse reagieren die hydratisierten Elektronen ausschließlich mit den Baseneinheiten und tragen daher nicht zur Bildung von Strangbrüchen bei ⁴. Da auch H- Atome vorwiegend mit den Baseneinheiten Additionsreaktionen eingehen und nur zu einem geringen Teil mit der Desoxyriboseeinheit reagieren, verursachen sie kaum Strangbrüche. Der überwiegende Anteil von Strangbrüchen geht auf den Angriff der OH- Radikale zurück.

Ein wesentlicher Schritt zur Aufklärung der strahleninduzierten Veränderungen in der DNA ist von Schulte-Frohlinde und von Sonntag unternommen worden. Als Übersicht siehe von Sonntag und Schulte-Frohlinde ¹⁸,

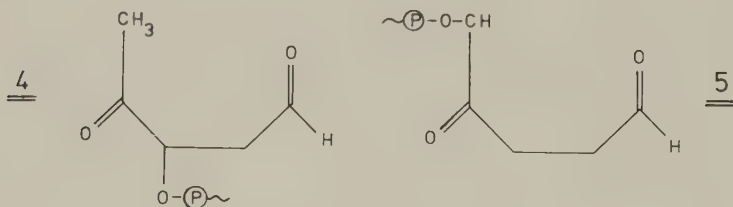
Schulte- Frohlinde ¹⁹ und von Sonntag et al. ²⁰. Aus den Erkenntnissen der Bestrahlung von Nukleotiden kann man erwarten, daß ca. 80% der gebildeten OH- Radikale mit den Basen und ca. 20% mit der Desoxyriboseeinheit unter Wasserstoffabstraktion reagieren ²¹. Die H-Abstraktion erfolgt nicht selektiv, sodaß fünf verschiedene Kohlenstoffradikale gebildet werden können ²²:



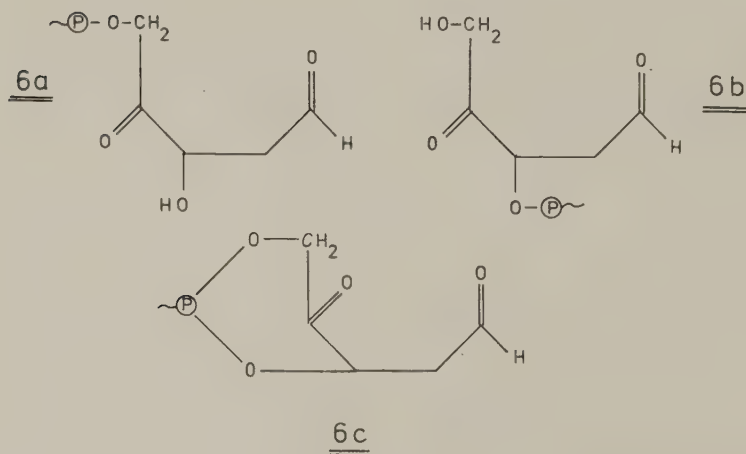
In Abwesenheit von Sauerstoff isolierten Dizdaroglu et al. ²³ bei der γ -Bestrahlung von DNA in wäßriger Lösung die veränderten freien Zucker 2,5-Didesoxypentos-4-ulose (2,5-Didesoxy-D,L-glycero-pentos-4-ulose)(1), 2,3-Didesoxypentos-4-ulose (2) und 2-Desoxypentos-4-ulose (2-DesoxyD,L-glycero-pentos-4-ulose)(3) :



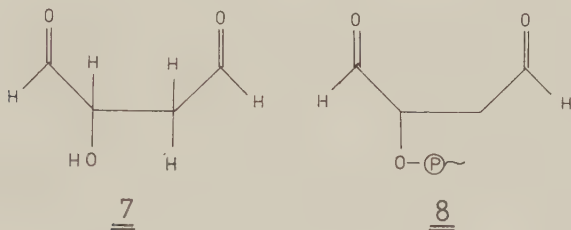
Beesk et al.²⁴ haben diese Zucker als Endgruppen, die noch über eine Phosphorsäureestergruppe an die DNA gebunden sind, identifiziert: (4), (5) und (6a, 6b oder 6c):



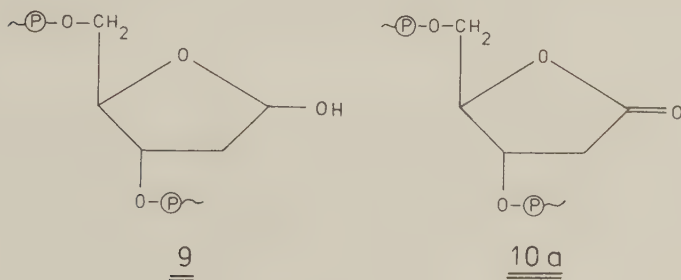
Im letzten Fall ist noch nicht geklärt worden, über welche der Phosphorsäureestergruppen der veränderte Zucker noch an die DNA- Kette gebunden ist:

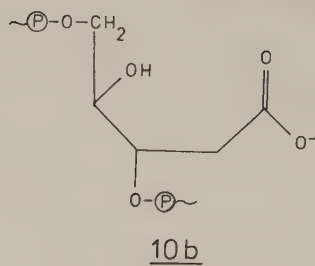
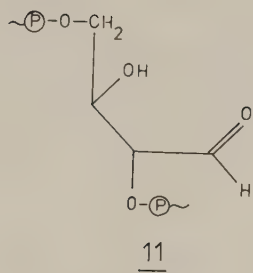


In Anwesenheit von Sauerstoff sind die Zucker 2-Desoxy-pentose-4-ulose (2-Desoxy-D,L-glycero-pentose-4-ulose)(3) und 2-Desoxytetrodialdose (7) in freier Form ²⁵ und gebunden an die DNA- Kette gefunden worden (6a, 6b oder 6c) und (8) ²⁶:

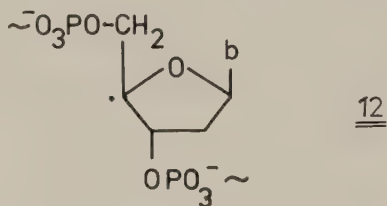


In bestrahlter wäßriger Lösung von DNA sind außerdem folgende "alkalilabile Stellen" nachgewiesen worden, die veränderte Zucker tragen und erst durch Alkalibehandlung zu Strangbrüchen führen (9), (10a) und (11)^{27,28}. Dabei tritt die 2-Desoxy-D-erythro-pentonsäureeinheit in An- und Abwesenheit von Sauerstoff auf, (9) und (11) dagegen nur in Gegenwart von Sauerstoff. Alkalibehandlung von (10a) öffnet den Ring, und es entsteht die freie Säure (10b):





Die Zucker (1) bis (6c) sind am C-4'- Atom oxidiert und resultieren von der Wasserstoffabstraktion am C-4':

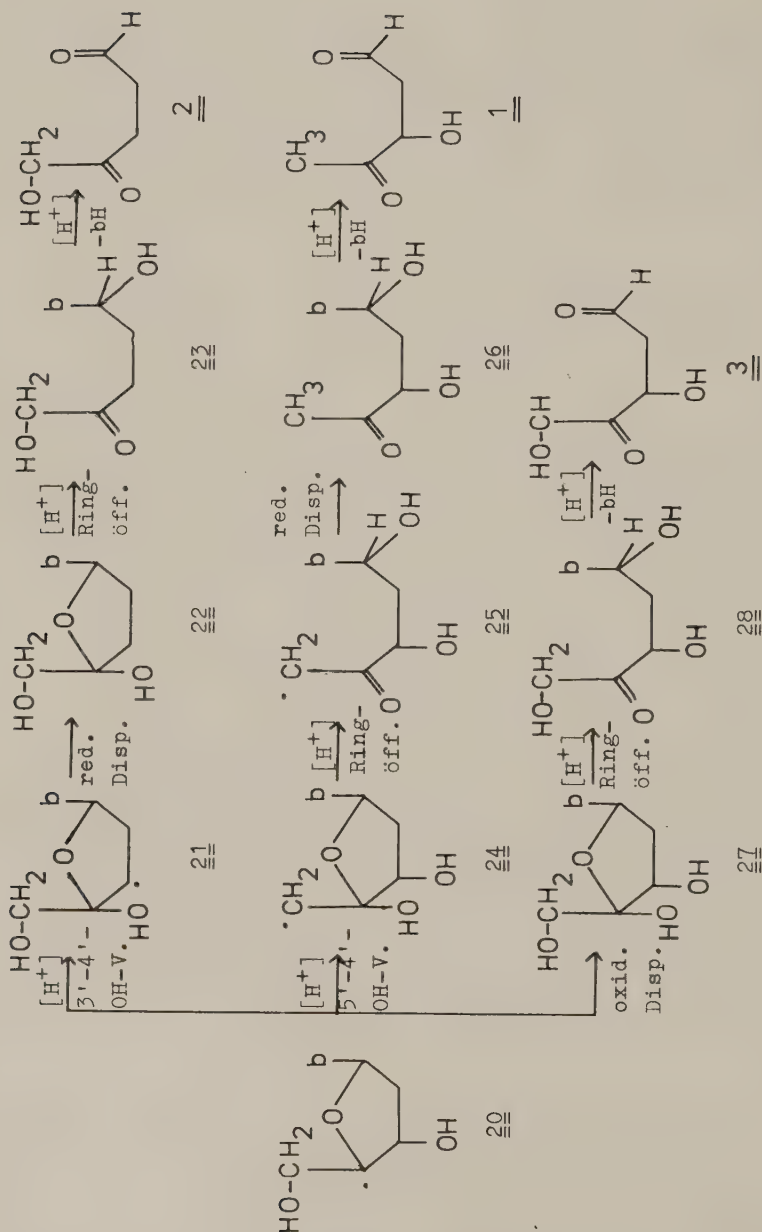


Ein solches Radikal kann wegen seines freien Elektrons in β -Stellung zu Phosphorsäureesterbindungen Phosphat eliminieren. Einen Mechanismus, der zu der Bildung der beschriebenen Produkte aus sauerstofffreien bestrahlten DNA- Lösungen führt, den C-4'- Mechanismus, haben Behrens et al. ²⁹ und Schulte- Frohlinde ¹⁰² aufgestellt.

Mit Hilfe von ESR- Untersuchungen an Modellsubstanzen ³⁰ wie Methoxyethylenphosphatradikalen wurde gezeigt, daß eine solche Phosphateliminierung nach einem S_N1 - Mechanismus verläuft und das Wasser an der Stelle der

Abgangsgruppe eintritt. Eine Abspaltung der zweiten Phosphatgruppe verläuft dann noch schneller auf dem gleichen Weg wie die Abspaltung der ersten, sodaß man das phosphatfreie Radikal (20) erhält. Die Folgereaktionen dieses Radikals sind in Schema 1 aufgeführt.

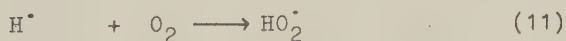
Für das Radikal (20) ergeben sich zwei Möglichkeiten für eine OH- Verschiebung, nämlich die von C-3' nach C-4' und die von C-5' nach C-4'. Aus der erstgenannten entsteht Radikal (21), das durch eine reduktive Disproportionierung in (22) und anschließende säurekatalysierte Ringöffnung in (23) und nachfolgende Basenabspaltung in das Produkt (2) übergeht. Die andere Möglichkeit führt über die 5'→4'- OH- Verschiebung zu Radikal (24), das durch Säurekatalyse einer Ringöffnung unterliegt (25). Die nachfolgende reduktive Disproportionierung liefert (26), und durch Abspaltung der Base entsteht das Produkt (1). Das Radikal (20) kann aber auch oxidativ disproportionieren, dann entsteht die Verbindung (27). An dieser Stelle führt die säurekatalysierte Ringöffnung zu Produkt (28) und die anschließende Basenabspaltung, ebenfalls unter Säurekatalyse, zu dem Produkt (3) (SCHEMA 1).



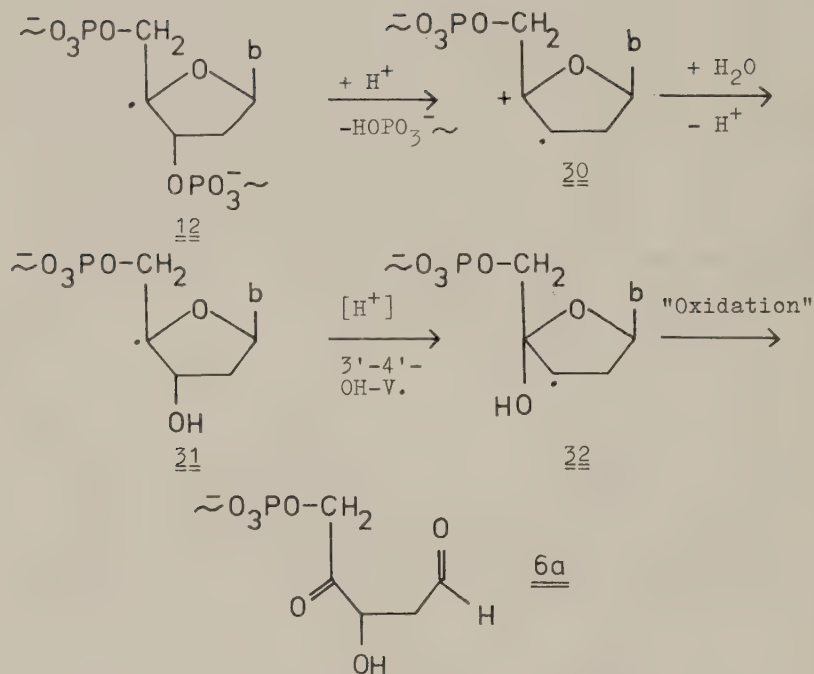
Schema 1: C-4'- Mechanismus für das Radikal (20) in sauerstofffreier Lösung- Entstehung freier Zucker.

Schema 2 zeigt ein Beispiel für die Entstehung einer veränderten DNA- Endgruppe. Hierbei tritt das Wasser sofort nach Abspaltung der ersten Phosphatgruppe in das Radikalkation (30) ein, wobei das Radikal (31) gebildet wird. An dieser Stelle ist eine säurekatalysierte 3' → 4'- OH- Verschiebung möglich, die zu Radikal (32) führt, welches durch eine unbekannte Spezies oxydiert wird und (6a) liefert (SCHEMA 2).

Bestrahlt man wäßrige DNA- Lösungen unter Sauerstoff, so treten DNA- und Sauerstoff in Konkurrenz mit den solvatisierten Elektronen und H- Atomen. (10) und (11):

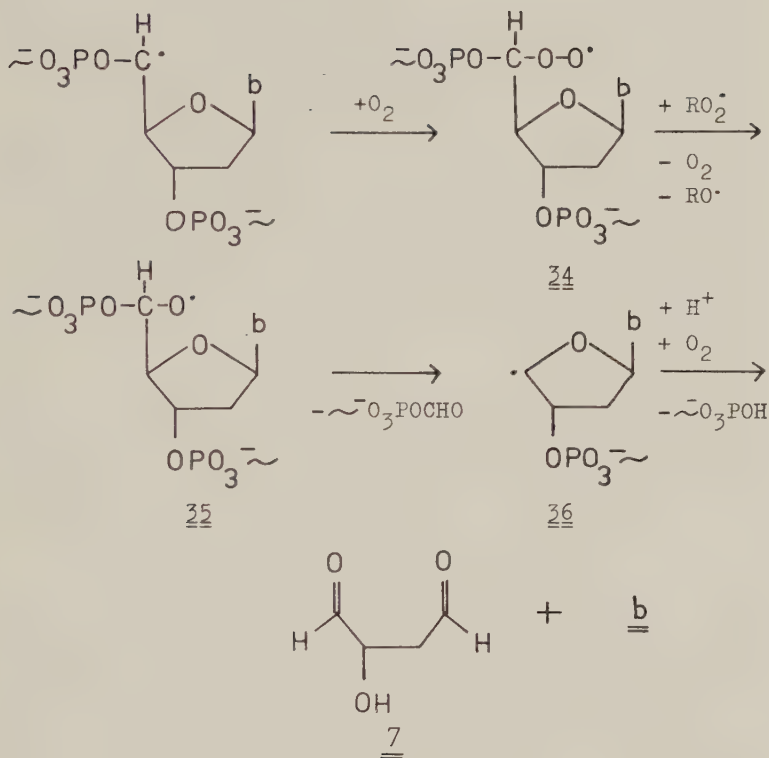


Es werden $HO_2^{\bullet}$ - Radikale gebildet (11). Diese stehen im Gleichgewicht mit $O_2^{\bullet -}$ - Radikalen (12), die aber nicht sehr reaktiv sind und keine Strangbrüche verursachen ⁴. Die Strangbrüche werden also wieder von OH- Radikalen hervorgerufen. Die durch H- Abstraktion entstehenden



Schema 2: C-4'- Mechanismus für das C-4'- Radikal in sauerstofffreier Lösung. Entstehung von Zuckerendgruppen.

fünf möglichen Desoxyribooseradikale können Sauerstoff addieren und Peroxylradikale bilden. Das C-5'- Peroxylradikal (34) in Schema 3 bildet mit einem weiteren Peroxylradikal ein Oxylradikal (35), welches zu (36) fragmentiert. Dabei ist die Spaltung des DNA- Stranges

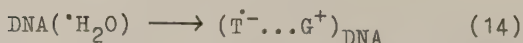
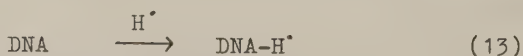


Schema 3: Zerfall des C-5'- Radikals in sauerstoffhaltiger Lösung.

durch die Spaltung einer C-C- Bindung entstanden, nämlich zwischen C-4' und C-5'. Über Wasseranlagerung, Basen- und Phosphatrestabspaltung entsteht der Zucker (7) (SCHEMA 3).

Alle aufgeführten Produkte sind bisher nur aus bestrahlten, verdünnten wäßrigen DNA- Lösungen isoliert worden, bei denen fast ausschließlich der indirekte Effekt auftritt. Bei der Bestrahlung von konzentrierten DNA- Gelen oder Zellkomponenten ist im wesentlichen die direkt in der DNA absorbierte Strahlenenergie wirksam, und der direkte Effekt tritt in den Vordergrund. Bei der Bestrahlung von trockener DNA kann nur noch der direkte Effekt untersucht werden.

Einige Autoren haben sich mit der Bestrahlung von trockener DNA oder DNA mit geringem Wassergehalt befaßt. Ihre Untersuchungen beschränken sich auf die Analyse von Einzel- und Doppelstrangbrüchen und Vernetzungen sowie auf Primäreffekte, die ESR- spektroskopisch analysiert werden können. Durch die Strahlung kann die DNA ionisiert werden, und es können H- Atome z.B. aus den Basen herausgeschlagen werden, sodaß freie Radikale entstehen (13). Nach Gräslund et al.³² werden auch ionische Basenradikale gebildet (14).



Die durch die Bestrahlung von trockener Kalbsthymus-DNA entstehenden Strangbruchraten sind u.a. von Hagen

und Wellstein untersucht worden ³³. Hier nehmen wie bei der Bestrahlung von Zellen die Einzel- und Doppelstrangbrüche (ssb bzw. dsb) linear mit der Dosis zu. Sie schließen daraus, daß ein Doppelstrangbruch durch ein einzelnes Trefferereignis entsteht. Aufgrund von Sedimentationsanalysen berechnen sie den G-Wert für die Einzelstrangbrüche $G(ssb) = 0,63$ unter Vakuum und für Doppelstrangbrüche $G(dsb) = 0,11$. Lücke- Huhle et al. ³⁴ finden unter anaeroben Bedingungen in Stickstoffatmosphäre für Einzelstrangbrüche und alkaliinduzierte Brüche einen G-Wert von $G(ssb + ali) = 0,72$ und für Doppelstrangbrüche $G(dsb) = 0,13$. Andere Autoren ³⁵ geben für Einzelstrangbrüche und alkaliinduzierte Brüche einen höheren Wert von $G(ssb + ali) = 1,15$ an.

Bei der Anwesenheit von Sauerstoff erhöht sich die Zahl der Einzelstrangbrüche beträchtlich, die der Doppelstrangbrüche nur wenig ³³: $G(ssb) = 3,4$ und $G(dsb) = 0,16$. Andere Autoren ^{34,36} finden für $G(ssb + ali)$ 1,4 bzw. 1,6 und für $G(dsb)$ 0,27 bzw. 0,06.

Vernetzungen können in γ -bestrahlter DNA zustande kommen, wenn ein Radikal auf ein anderes Molekül trifft oder zwei Radikale kombinieren. Jedoch ist die Beweglichkeit ³⁷ von zwei Molekülen in trockenen Systemen sehr stark eingeschränkt. Dagegen kann bei gequollener DNA oder DNA mit höherem Wassergehalt die Zahl der Vernetzungen in Abwesenheit von Sauerstoff ansteigen ^{38,39}. Wird in

Anwesenheit von Sauerstoff bestrahlt, so treten in den Gelen weniger Vernetzungen durch den direkten Effekt auf als durch den Angriff des OH- Radikals das Molekül degradiert wird ³⁷. Hagen und Wellstein ³³ finden bei der Bestrahlung von trockener DNA im Vakuum einen G-Wert von $G(\text{Vernetzung}) = 0,37$ und unter Sauerstoffatmosphäre $G(\text{Vernetzung}) = 0,16$. Sie deuten den niedrigeren Wert unter Sauerstoff dadurch, daß DNA- Radikale mit Sauerstoff Peroxylradikale bilden können, die dann keine Vernetzungen eingehen. Dieser Effekt wird auch von Lett und Alexander ⁴⁰ angenommen.

Setzt man nun die DNA in Zellen einer ionisierenden Strahlung aus, so hat man es mit einem System, das zwischen den beiden Extremen - der DNA in wäßriger Lösung als Modell für den indirekten Effekt und der trockenen DNA als Modell für den direkten Effekt - liegt, zu tun ⁴¹.

In eukariotischen Zellen liegt die DNA nicht homogen verteilt vor, sondern ist in den Zellkernen dicht assoziiert zusammen mit Histonen und Nicht- Histon- Proteinen im sogenannten Chromatin. Durch γ -Bestrahlung kann es daher außer den bereits erwähnten Schädigungen an der DNA auch zu Protein- DNA- Vernetzungen kommen ⁴². Um den Einfluß, den die Proteine bei der γ -Bestrahlung auf die DNA ausüben, näher zu untersuchen, ist von Lücke- Huhle et al. ³⁴ trockenes Nukleoprotein bestrahlt und hinsichtlich der Strangbrüche untersucht worden.

Die G-Werte für die Strangbrüche betragen unter Stickstoff $G(ssb + ali) = 1,6$ und $G(dsb) = 0,07$ und unter Sauerstoff $G(ssb + ali) = 5,3$ und $G(dsb) = 0,37$. Hier treten Einzelstrangbrüche häufiger auf als bei reiner DNA, es werden möglicherweise Radikale aus den Proteinen auf die DNA übertragen.

Ein weiterer Schritt, der zur Aufklärung der Strahlenschäden in Zellen dienen soll, ist von Mee et al.⁴³ unternommen worden. Sie haben Chromatin aus Lungenfibroblasten chinesischer Hamster isoliert und als Gel bestrahlt. Der aus ihren Daten errechnete G-Wert für Einzelstrangbrüche, bezogen auf die DNA, beträgt $G(ssb + ali) = 16,7$. Die Gasbedingungen sind nicht angegeben, wahrscheinlich ist unter Luft bestrahlt worden. Bei der Bestrahlung des Chromatins in den Zellen erhalten sie $G(ssb + ali) = 1,25$, bezüglich DNA. Bezieht man diesen G-Wert auf die absorbierte Energie in der gesamten bestrahlten Zelle, so erhält man 0,02. Die DNA ist im Chromatin gegenüber der DNA in γ -bestrahlter DNA-Lösung stärker geschützt ($G = 0,4$, bezüglich absorbierter Energie in der Lösung⁴⁴).

Bohne et al.⁴⁵ haben Strangbrüche nach der Bestrahlung von Phagen in Suspensionen unter Stickstoff bestimmt. Die G-Werte, bezogen auf DNA betragen $G(ssb + ali) = 1,15$ und $G(dsb) = 0,06$. Bei der Bestrahlung von Bakterien- und Säugerzellen steigen sowohl die Zahl der Einzelstrangbrüche als auch die der Doppelstrangbrüche linear mit der Dosis

an. Von den in einer lebenden Zelle erzeugten Einzelstrangbrüchen bleiben normalerweise nicht alle wirksam, denn in der lebenden Zelle kann ein Teil über die zell-eigenen Enzyme repariert werden, sodaß die genetische Information erhalten bleibt ^{17, 46-48}. Von den alkali-labilen Stellen gibt es mindestens zwei Typen, die biologische Bedeutung haben, der eine ist letal und liefert Einzelstrangbrüche bei Behandlung mit Alkali, der andere ist nicht letal und wird erst durch Alkali in den letalen Schaden überführt ⁴⁹. Dabei ist der erste Typ strukturell verschieden von den Apurinsäuren und Apyrimidinsäuren ⁵⁰ (Stellen an der DNA, die die Basen verloren haben). Roots und Okada ⁵¹ zeigen, daß die OH- Radikale verantwortlich sind für letale Schäden und Strangbrüche in vivo.

Das Ausmaß an Strangbrüchen wird nicht nur durch die Reparatur in der Zelle reduziert, sondern auch durch die Vielzahl von Radikalfängern in der Zelle beeinflusst. SH- Gruppen tragende Verbindungen wie Glutathion können DNA- Radikale reparieren und dadurch schützend wirken ^{52,53}. Chloridionen ⁵⁴, auch Alkohole ^{5,51} wirken als Radikal-fänger. Als Beispiel für die Bestrahlung von Zellen sei die Bestrahlung der Rattenthymocyten ⁵⁵ genannt. Es ergeben sich auf DNA bezogen folgende Strangbruchraten: unter Stickstoffatmosphäre $G(ssb + ali) = 0,50$ und $G(dsb) = 0,03$ und unter Sauerstoff $G(ssb + ali) = 1,82$

und $G(\text{dsb}) = 0,09$. Coquerelle et al. ⁵⁶ geben bei der Bestrahlung unter Luft $G(\text{ssb} + \text{ali}) = 0,92$ und $G(\text{dsb}) = 0,05$ an.

Sauerstoff dient im allgemeinen als Strahlensensibilisator. Für Strangbrüche werden O.E.R.- Werte von 3 bis 4 in bestrahlten Säugetierzellen ^{55,57,58} angegeben.

Außer den Strangbruchanalysen sind schon einige Versuche über die biologischen Veränderungen in Zellen nach deren γ -Bestrahlung, u.a. die Bestimmung der biologischen Aktivität unternommen worden. Aber über die chemischen Veränderungen, z.B. Bestrahlungsprodukte aus der Desoxyriboseeinheit der DNA, bei der γ -Bestrahlung von Zellen, auch Zellkernen, Chromatin oder trockener DNA, liegen bisher noch keine Untersuchungen vor.

II ZIEL DER ARBEIT

Bisher dient die DNA in wäßriger Lösung als Modell für die strahleninduzierten Veränderungen der DNA in der Zelle. Neuerdings gehen aber die Überlegungen dahin, daß trockene DNA oder DNA in sehr konzentrierten Lösungen besser den Verhältnissen der DNA in einer Zelle entspricht als DNA in verdünnter wäßriger Lösung. Im Gegensatz zur Lösung macht in fester DNA der direkte Strahleneffekt den größeren Anteil am Strahlenschaden aus.

Die vorliegende Arbeit soll einen Beitrag zu den strahlenchemischen Veränderungen an der DNA im festen Zustand liefern. Bisher ist noch nicht versucht worden, niedermolekulare Produkte, die aus der γ -Bestrahlung von trockener DNA resultieren, zu isolieren und zu identifizieren. Daher soll untersucht werden, ob veränderte Zucker oder Zuckerendgruppen wie bei der γ -Bestrahlung von wäßrigen DNA-Lösungen auch bei der Bestrahlung fester DNA nachgewiesen werden können.

Die DNA-Strangbrüche, die durch γ -Bestrahlung von wäßrigen DNA-Lösungen entstehen, sind auf die Bildung von veränderten Zuckern und Zuckerendgruppen zurückzuführen. Nach den Mechanismen, die zur Bildung der

Strangbrüche und auch zur Entstehung von alkalilabilen Stellen führen, werden Basen von der DNA abgespalten. Danach sollte die Menge an freigesetzten Basen der Summe aus der Strangbruchrate und der Bildung von alkalilabilen Stellen entsprechen.

Die vorliegende Arbeit soll zeigen, ob bei der γ -Bestrahlung von fester DNA ebenfalls Basen freigesetzt werden und auch ob eine Korrelation zwischen Basenfreisetzung und Strangbruchrate besteht. Es werden DNA- Proben mit unterschiedlichen Wassergehalten und DNA- Proben, die mit Methanol bzw. tert. Butanol als Radikalfänger versetzt werden, bestrahlt. Die Bestrahlungen werden sowohl im Vakuum als auch unter Sauerstoff durchgeführt.

Ein weiterer Teil der Arbeit beschäftigt sich mit strahleninduzierten Veränderungen an der Desoxyriboseeinheit der DNA, die mit 2-Thiobarbitursäure malonaldehydähnliche Reaktionen eingehen.

Darüber hinaus - die Freisetzung von Basen betreffend - sollen die Untersuchungen erstmals auf Zellorganellen, nämlich die DNA- reichen Zellkerne aus Hühnererythrozyten, ausgedehnt werden.

III ERGEBNISSE

3.1. Baseneliminierung

3.1.1. Analytik der Bestrahlungsprodukte

Bei der γ -Bestrahlung von DNA in verdünnter wäßriger Lösung wurden von anderen Autoren die Nukleobasen der DNA als Bestrahlungsprodukte analysiert ⁵⁹⁻⁶⁴. In der vorliegenden Arbeit wurden die strahlenchemischen Veränderungen, die bei der Bestrahlung von fester DNA entstanden, im Hinblick auf niedermolekulare Produkte untersucht. Unter verschiedenen Bestrahlungsbedingungen konnten auch bei fester DNA die vier Basen, Thymin, Cytosin, Adenin und Guanin isoliert werden.

Zur qualitativen Analyse der freigesetzten Basen wurde die bestrahlte DNA in Wasser aufgelöst und mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel 60 G F₂₅₄ untersucht. Es ergaben sich folgende R_F -Werte: Guanin 0,07; Cytosin 0,14; Adenin 0,34; Thymin 0,55 (Fließmittel (1)). Phosphatgruppen enthaltende Komponenten wie Nukleotide blieben am Startpunkt ($R_F = 0$). Da das günstigste Verhältnis von Basen zu Nukleotiden bei hohen Bestrahlungsdosen nur ca. 1 : 100 betrug, war eine quantitative Auswertung, insbesondere für eine Dosisabhängigkeit, ohne vorherige Abtrennung der Nukleotide nicht

möglich.

Die phosphathaltigen Bestrahlungsprodukte wie Nukleotide, Oligonukleotide und nicht abgebaute DNA wurden mittels Säulenchromatographie an einem Sephadex- Anionenaustauscher abgetrennt. Als stationäre Phase diente DEAE- Sephadex A 25^{63,65}. Die Elution der Produkte mit 0,02 M Tris- HCl- Puffer (pH 7,6) wurde durch die Absorption bei einer Wellenlänge von 254 nm verfolgt. Ein typisches Chromatogramm zeigt Abbildung 1.

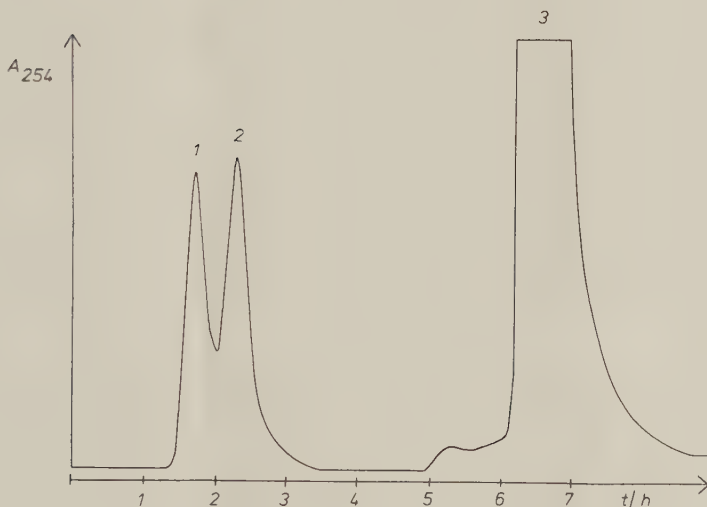


Abb. 1: Säulenchromatographie von γ -bestrahlter DNA an DEAE- Sephadex A 25. 1: Pyrimidine, 2: Purine, 3: Nukleotide

Die Basenfraktion, die aus den Pyrimidinen (Peak 1) und den Purinen (Peak 2) bestand, wurde mit einer Retentionszeit von 84 bis 360 Minuten eluiert. Die Phosphatgruppen enthaltenden Komponenten adsorbierten am Ionenaustauscher und konnten mit 2 M Kochsalzlösung eluiert werden (Peak 3).

Die Basenfraktion wurde mit Hilfe der Hochdruckflüssigkeitschromatographie an einer Nukleosil 5 SA- Säule mit Triethylammoniumacetatpuffer als Elutionsmittel (pH 4,6) aufgetrennt.

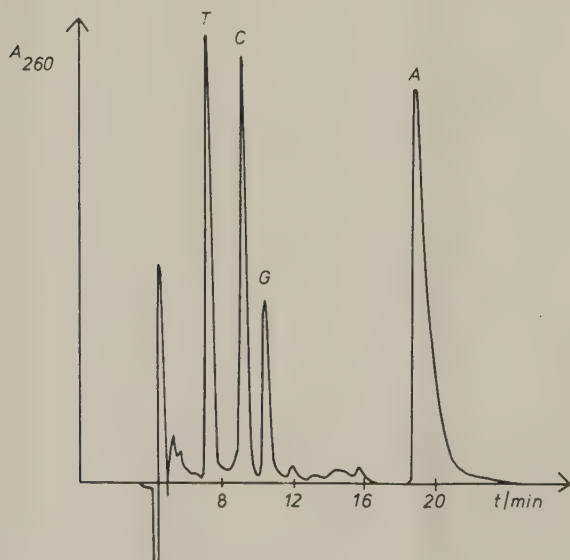


Abb. 2: Hochdruckflüssigkeitschromatographie von bestrahlter DNA an Nukleosil 5 SA. T: Thymin, C: Cytosin, G: Guanin, A: Adenin

Die Absorption wurde bei 260 nm aufgezeichnet. Abbildung 2 zeigt ein typisches Chromatogramm für die Bestrahlung von DNA. Authentisches Material diente zur Identifizierung und Eichung der einzelnen Basen. Die Retentionszeiten betrugen für Thymin 6,9 Minuten, für Cytosin 8,8, Guanin 10,1 und für Adenin 18,6 Minuten.

3.1.2. γ -Bestrahlung von Kalbsthymus- DNA

Zur Bestrahlung wurde käufliche DNA in festem Zustand eingesetzt. Diese DNA ist mit einer Hydrathülle umgeben, die aus einer primären, einer sekundären und einer tertiären Schicht besteht. Die primäre Hydrathülle unterscheidet sich in ihren physikalisch- chemischen Eigenschaften von den Hydrathüllen in normalem flüssigem Wasser³¹. Infolge der erheblichen Immobilisierung der Wassermoleküle können Ionen dieser Schicht nicht mit der gleichen Aktivierungsenergie diffundieren wie in flüssigem Wasser.

In dieser primären Hydrathülle unterscheidet man drei Arten von Wassermolekülen: Am festesten sind zwei Wassermoleküle durch Ion- Dipol- Wechselwirkung an das saure PO_2^-Na^+ des Phosphats gebunden. Etwas weniger fest gebunden sind vier Wassermoleküle über Wasserstoffbrücken an der C-O-C- Bindung des Sauerstoffatoms der Pentose und den P-O-C- Bindungen der Sauerstoffatome der Phosphodi-

esterbrücken. Am wenigsten fixiert sind ca. fünf Wassermoleküle, die mit den Basen in den Kurvaturen der Helix in Wechselwirkung stehen. Insgesamt wird die primäre Hydrathülle aus 11 bis 12 Wassermolekülen pro Nukleotidmolekül gebildet.

Die Wassermoleküle der sekundären Hydrathülle sind nicht direkt an die DNA gebunden. Es handelt sich dabei um sechs bis acht Wassermoleküle, die an die Wassermoleküle der ersten Schicht über Wasserstoffbrücken gebunden sind.

Die tertiäre Hydrathülle unterscheidet sich nur sehr wenig vom normalen flüssigen Wasser und ist für Ionen durchlässig. Bei einer relativen Luftfeuchtigkeit oberhalb von 80% entsprechen alle drei Hydrathüllen dem nativen Zustand der festen DNA. Das molare Verhältnis von adsorbiertem Wasser zu DNA beträgt dann ca. 20 Moleküle H_2O / Nukleotid ⁹⁹.

Die käufliche DNA enthält bei normaler r.L. ca. 30% Wasser ¹⁰⁰, wobei der DNA-Gehalt über die Absorption bei 260 nm photometrisch bestimmt werden kann. Nach 18- bis 20- stündigem Trocknen bei Raumtemperatur bis zur Gewichtskonstanz ließen sich davon 4 bis 9% des Wassers entfernen. Für die getrocknete DNA bedeutet dies, daß sie die tertiäre, die sekundäre und einen Teil der primären Hydrathülle verloren hat, aber noch die zwei

Wassermoleküle der primären Hydrathülle, die die $\text{PO}_2^- \text{Na}^+$ -Gruppen hydratisieren und sehr fest gebunden sind und wahrscheinlich noch die etwas lockerer gebundenen vier Wassermoleküle an den P-O-C- bzw. C-O-C-Bindungen enthält. Im folgenden wird die - wie oben beschrieben - getrocknete DNA, die infolge ihres fest gebundenen Wassers, das noch ca. 20% Wasser ausmacht, als "trocken" bezeichnet und entspricht damit dem Zustand der DNA, die von anderen Autoren als trocken bestrahlt bezeichnet wird.

Die DNA wurde in trockenem bzw. angefeuchteten Zustand im Innenfeld der Co-60- γ -Quelle bei 0°C mit einer Dosisleistung von 9 Gy s^{-1} bestrahlt. Die Einwaage an DNA bezog sich auf die - wie oben beschrieben - getrocknete DNA. Die angefeuchteten DNA-Proben hatten folgende Zusammensetzung: (Angaben in Gewichtsprozent)

DNA / H_2O : 74% / 26%

DNA / H_2O : 33% / 67%

DNA / H_2O : 17% / 83%

Zur Verminderung der OH- Radikalkonzentration durch das hinzugefügte Wasser wurde in weiteren Versuchen die Hälfte des Wasservolumens durch die Radikalfänger Methanol bzw. tert. Butanol ersetzt. Es wurden folgende Systeme bestrahlt: (Gewichtsprozent)

DNA / H_2O / MeOH : 36% / 36% / 28%

und

DNA / H_2O / t-BuOH : 36% / 36% / 28%.

Die Bestrahlung erfolgte sowohl im Hochvakuum als auch unter Sauerstoff. Die Ausbeuten der wie unter 3.1.1. analysierten Basen wurden jeweils auf 100 mg der eingesetzten trockenen DNA bezogen. Die Abbildungen A1 bis A10 im Anhang geben die Abhängigkeit der abgespaltenen Basen von der Dosis wieder. Wegen der sehr geringen Löslichkeit von Guanin in Wasser (10^{-5} M) waren nicht in allen HPLC- Chromatogrammen Signale für Guanin zu sehen. Zur Berechnung der Freisetzung der Basensumme aller vier DNA- Basen wurde der Anteil an freigesetztem Guanin entsprechend dem Guanin/Cytosin Verhältnis der Kalbsthymus- DNA von 1:1 gleich dem an Cytosin gesetzt. Die Zusammensetzung der Kalbsthymus- DNA gibt Tabelle 1 wieder ⁶⁶.

Tabelle 1: Zusammensetzung der Basen in Kalbsthymus-
DNA (%)

Adenin	Guanin	Cytosin	Thymin	$\frac{A + T}{G + C}$
28,2	21,5	21,2	27,8	1,31

In Abbildung 3 sind die Ausbeuten an abgespaltenen Basen gegen die Dosis bei den verschiedenen Bestrahlungen von DNA im Vakuum bzw. unter Sauerstoff aufgetragen. In allen Fällen ist ein deutlicher Sauerstoffeffekt erkennbar.

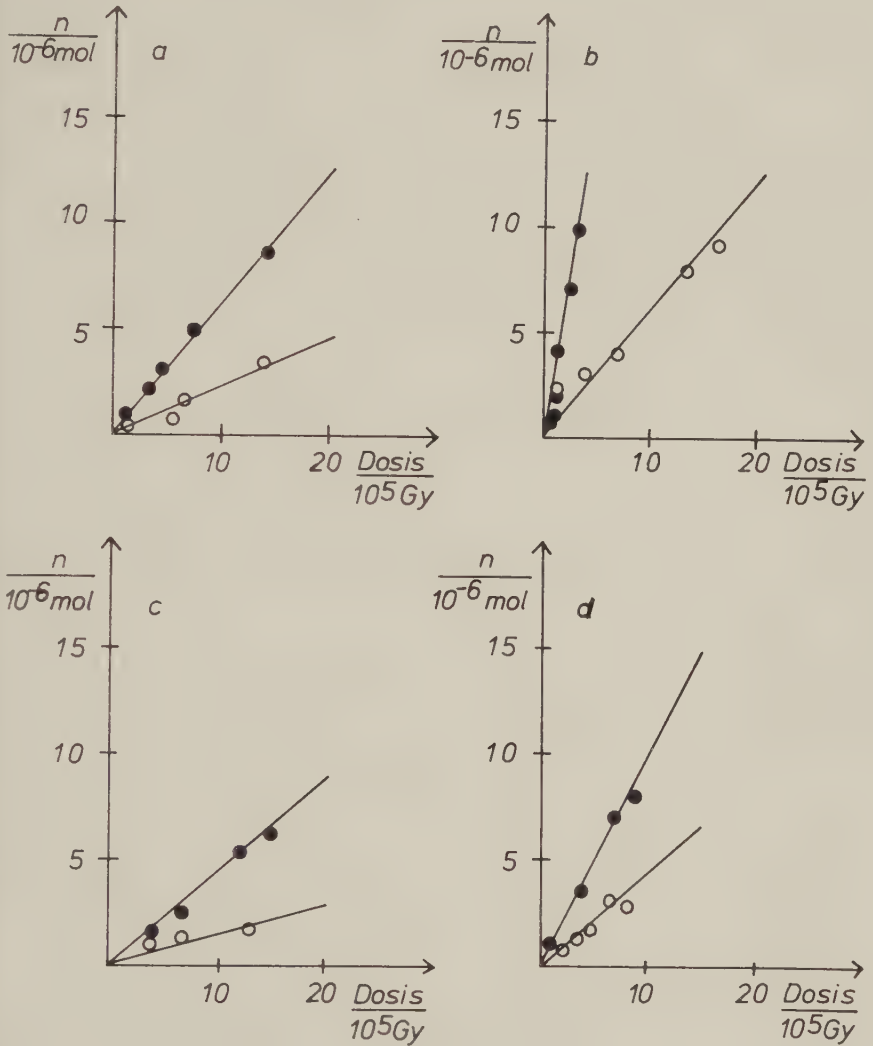


Abb. 3: Dosisabhängigkeit der Basenabspaltung bei der γ -Bestrahlung von DNA (0°C). Dosisleistung: 9 Gy s^{-1} .
a: DNA (trocken) b: DNA / H_2O : 33% / 67%
c: DNA / H_2O / MeOH : 36% / 36% / 28%
d: DNA / H_2O / t-BuOH : 36% / 36% / 28%
 Bestrahlung im Vakuum $\circ$; unter Sauerstoff $\bullet$

3.1.2.1. Dosisabhängigkeit

Aus der Anzahl der freigesetzten Mole an Basen läßt sich der G-Wert für die Baseneliminierung bei der dazugehörigen Dosis ermitteln. Der G-Wert ist allgemein als die Zahl der umgesetzten Molekeln pro 100 eV absorbiertener Strahlenenergie definiert. Er errechnet sich nach folgender Formel,

$$G = \frac{\text{Base (mol)} \cdot 6,023 \cdot 10^{23} \cdot 100}{\text{Dosis (rad)} \cdot 6,24 \cdot 10^{13} \cdot \text{DNA(g)}}$$

wobei die Mole an entstandener Base auf die Einwaage an trockener DNA bezogen werden. (100 rad $\hat{=}$ 1 Gy)

Aus Abbildung 3 ist zu sehen, daß die Steigung der Geraden bei der unter Sauerstoff bestrahlten DNA (DNA / H₂O : 33% / 67%) am größten ist (Abb. 3b). Bis zu einer absorbierten Dosis von $3,3 \cdot 10^5$ Gy verlief der Anstieg der Basenabspaltung linear. Unter Zugrundelegung des G-Wertes von 2,76 für die Basenabspaltung und einer eingesetzten DNA- Menge von 100 mg, die $3 \cdot 10^{-4}$ Mol Nukleotideinheiten entsprechen, wurden bei einer absorbierten Dosis von $3,3 \cdot 10^5$ Gy $9,6 \cdot 10^{-6}$ Mol Basen abgespalten. Dies entsprach einem Abbau von 3% der eingesetzten DNA- Nukleotideinheiten. Bei einer absorbierten Dosis oberhalb von $3,3 \cdot 10^5$ Gy verringerte sich der Anstieg gemäß Abbildung 4, d.h. die Basenausbeute stieg nicht mehr linear mit der Dosis an. Denn oberhalb dieses

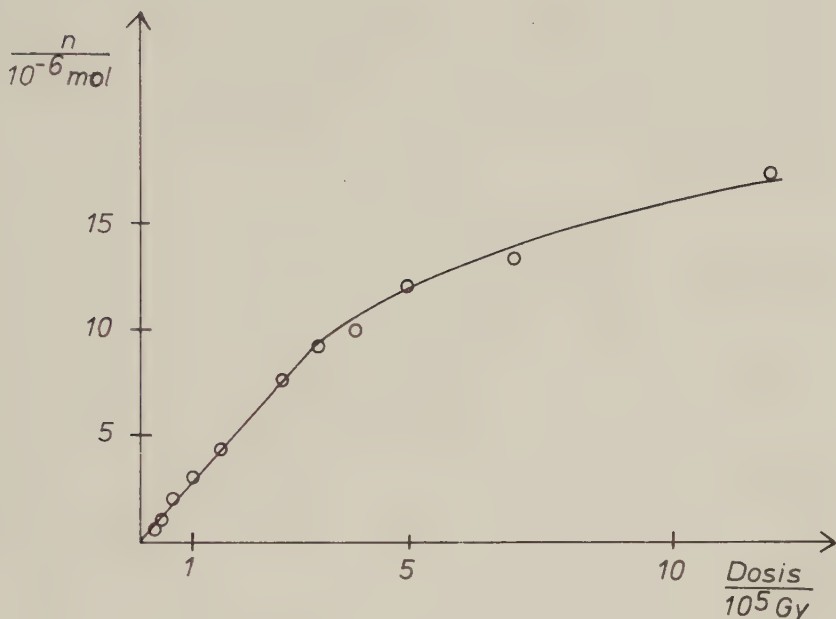


Abb. 4: Dosisabhängigkeit der Basenausbeute von bestrahlter DNA (DNA / H_2O : 33% / 67%) unter Sauerstoff bei 0°C . Dosisleistung: 9 Gy s^{-1}

Grenzwertes verringert sich die Wahrscheinlichkeit für ein γ -Quant, ein ungeschädigtes DNA-Molekül zu treffen, während die Möglichkeit steigt, eine bereits abgespaltene Base zu zerstören, was sich in einem Absorptionsverlust oder durch Auftreten von Sekundärprodukten bemerkbar macht. Daher wurde auch bei der Bestrahlung der anderen DNA-Systeme jeweils die höchste Dosis so gewählt, daß die mögliche Basenabspaltung 3% der vorhandenen Basen nicht überstieg.

Für die Bestrahlung von DNA / H_2O : 33% / 67% unter Sauerstoff erhält man einen konstanten G-Wert, solange die Abspaltung der Basen unter 3% liegt. Oberhalb dieses Bereiches fällt der G-Wert, wie aus Abbildung 5 zu sehen ist, ab.

Eine Übersicht über die G-Werte der Basenfreisetzung bei den verschiedenen DNA- Systemen, die der Bestrahlung im Vakuum bzw. unter Sauerstoff unterworfen wurden, gibt Tabelle 2. Die G-Werte wurden jeweils aus der Steigung der Geraden der Diagramme (Abbildungen A1 bis A10 im Anhang) ermittelt.

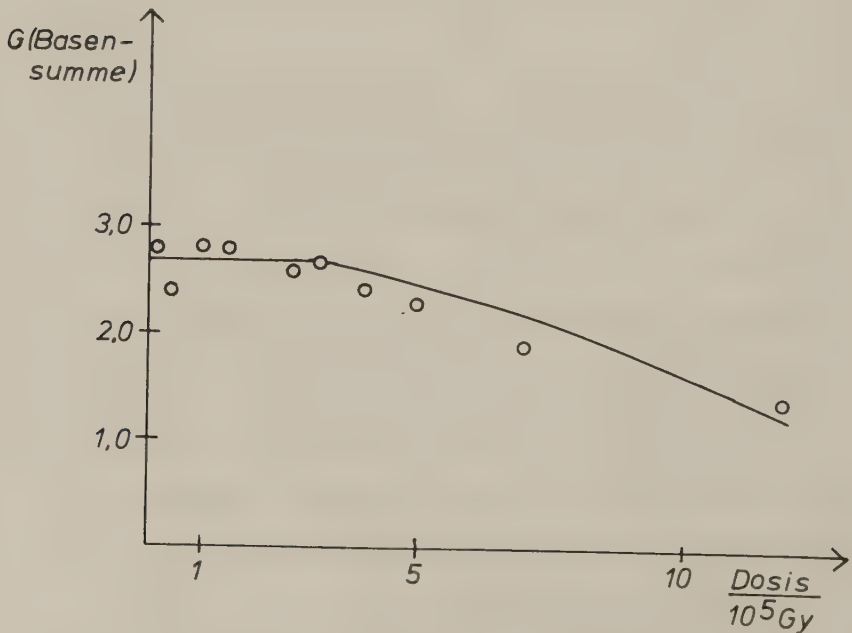


Abb. 5: G-Wert (Basensumme) für die Bestrahlung von DNA / H_2O : 33% / 67% unter Sauerstoff bei 0°C.

Tabelle 2: G-Wert für die Summe der abgespaltenen Basen
aus γ -bestrahlter DNA bei 0°C, bezogen auf die
Einwaage an trockener DNA. Dosisleistung: 9 Gy s⁻¹
(Angaben in Gewichtsprozent)

Bestrahlung von	G (Basensumme)	
DNA (trocken)	Vakuum	0,2
DNA / H ₂ O :		ca. 0,2
74% / 26%		
DNA / H ₂ O :		0,56
33% / 67%		
DNA / H ₂ O :		0,8 - 0,9
17% / 83%		
DNA (trocken)	Sauerstoff	0,6 - 0,7
DNA / H ₂ O :		2,76
33% / 67%		
DNA / H ₂ O / MeOH :	Vakuum	0,12
36% / 36% / 28%		
DNA / MeOH :		ca. 0,01
20% / 80%		
DNA / H ₂ O / t-BuOH :		0,44
36% / 36% / 28%		
DNA / H ₂ O / MeOH :	Sauerstoff	0,4
36% / 36% / 28%		
DNA / H ₂ O / t-BuOH :		1,04
36% / 36% / 28%		

Die G-Werte für die Abspaltung der einzelnen Basen sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: G-Wert für die Abspaltung der Basen aus γ -bestrahlter DNA bei 0°C, bezogen auf die Einwaage an trockener DNA. Dosisleistung: 9 Gy s^{-1} . (Angaben in Gewichtsprozent)

Bestrahlung im <u>Vakuum</u>	G(T)	G(C)	G(A)
DNA (trocken)	0,05	0,05	0,05
DNA / H ₂ O : 74% / 26%	0,05	0,05	0,08
DNA / H ₂ O : 33% / 67%	0,14	0,12	0,18
DNA / H ₂ O : 17% / 83%	0,20	0,20	0,28
DNA / H ₂ O / MeOH : 36% / 36% / 28%	0,03	0,02	0,04
DNA / MeOH : 20% / 80%	0,002	0,003	0,003
DNA / H ₂ O / t-BuOH : 36% / 36% / 28%	0,12	0,07	0,09
Bestrahlung unter <u>Sauerstoff</u>			
DNA (trocken)	0,13	0,16	0,19
DNA / H ₂ O : 33% / 67%	0,69	0,69	0,69
DNA / H ₂ O / MeOH : 36% / 36% / 28%	0,1	0,1	0,1
DNA / H ₂ O / t-BuOH : 36% / 36% / 28%	0,26	0,26	0,26

Die Ausbeute an freigesetzten Basen erhöht sich in allen bestrahlten DNA- Systemen mindestens um den Faktor 2. Dieser Sauerstoffeffekt ist aus Tabelle 4 ersichtlich.

Tabelle 4: Sauerstoffeffekt (OER) für die Eliminierung von Basen aus γ -bestrahlter DNA

System	OER
DNA (trocken)	3 - 3,5
DNA / H ₂ O : 33% / 67%	4,6
DNA / H ₂ O / MeOH : 36% / 36% / 28%	3,3
DNA / H ₂ O / t-BuOH : 36% / 36% / 28%	2,4

3.1.3. Bestrahlung von Zellkernen aus Hühnererythrozyten

3.1.3.1. Isolierung von Zellkernen

Zur Untersuchung von strahleninduzierten Veränderungen der DNA in Zellen sind die Erythrozytenkerne von Vögeln besonders wegen ihres hohen DNA- Gehaltes geeignet. Im Gegensatz zu den Erythrozyten von Säugetieren bleibt der Zellkern bei den Vögeln in einem inaktiven Zustand in den reifen Erythrozyten erhalten ^{67,68}.

Die Isolierung der Erythrozyten erfolgte nach einem von Gilmour Harris (Kennedy-Institute of Rheumatology, London) erprobten Verfahren (persönliche Mitteilung, in meiner Diplomarbeit beschrieben ⁸⁴). Nach der Lysis wurden die Erythrozytenkerne bei -18°C aufbewahrt. Die chemische Zusammensetzung eines Erythrozytenkerns ist aus Tabelle 5 ersichtlich ^{69,70}. Die Basenanteile in der DNA betragen 28,8% Adenin, 20,5% Guanin, 21,5% Cytosin und 29,2% Thymin ⁷¹.

Tabelle 5: Chemische Zusammensetzung eines Erythrozytenzellkerns bezüglich Trockengewicht

	pg (pg = 10 ⁻¹² g)	%
DNA	1,70	34,34
RNA	0,13	2,63
Protein	3,02	61,01
Phospholipide	0,08	1,62
Cholesterin	0,016	0,32
Gesamtgewicht	4,95	

3.1.3.2. Bestrahlung von Zellkernen und Dosisabhängigkeit

Die abzentrifugierten und gewaschenen Zellkerne wurden als Pellet sowohl im Vakuum als auch unter Sauerstoff bei 0°C im Innenfeld der Co-60-γ-Quelle mit einer

Dosisleistung von 9 Gy s^{-1} bestrahlt. Nach der Bestrahlung mußten die Zellkerne lysiert werden. Dies geschah nach Zugabe von Wasser durch Ultraschallbehandlung und anschließende Inkubation mit dem proteolytischen Enzym Proteinase K. Die so erhaltene klare Lösung wurde zur Abtrennung der Basen, wie unter 3.1.1. beschrieben, an der DEAE- Sephadex A25- Säule chromatographiert.

Die nicht adsorbierenden Basen wurden durch Hochdruck-flüssigkeitschromatographie aufgetrennt (Abbildung 6). Die Ausbeute an Basen ist in Abbildung A11 für die Bestrahlung im Vakuum und in Abbildung A12 im Anhang für die Bestrahlung unter Sauerstoff gegen die Dosis aufgetragen. Bei dem angewendeten Analysenverfahren kann über die Herkunft der Basen keine Aussage gemacht werden, da die Basen sowohl aus der DNA als auch aus der RNA abgespalten werden können. Da der RNA- Anteil aber nur 7,6% im Vergleich zum DNA- Anteil ausmacht, kann innerhalb des Meßfehlerbereiches der Basenanteil, der aus der RNA stammt, vernachlässigt werden.

Der Wassergehalt des zu bestrahlenden Pellets wurde durch Gefriertrocknung bestimmt und betrug 81,4%. In anderen Versuchen wurden die gefriergetrockneten Zellkerne im Vakuum bestrahlt. In weiteren Versuchen wurden die Zellkernmembranen durch Verdünnen mit Wasser und Ultraschallbehandlung zerstört. Die erhaltene Suspension von Zellkernkomponenten wurde anschließend gefrier-

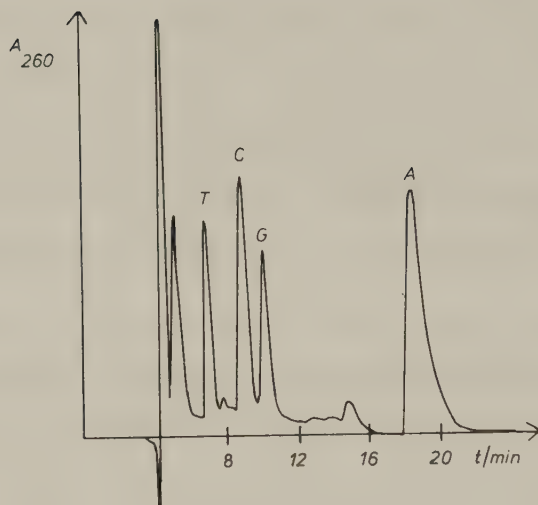


Abb. 6: Hochdruckflüssigkeitschromatographie von bestrahlten Zellkernen an Nukleosil 5 SA. T: Thymin, C: Cytosin, G: Guanin, A: Adenin

getrocknet und mit der Wassermenge, die den Zellkernen bei der Bestrahlung im Pellet entsprach, erneut versetzt. Die auf diese Weise zerstörten Zellkerne wurden im Vakuum bzw. unter Sauerstoff bestrahlt und auf abgespaltene Basen hin untersucht.

Für die Berechnung des G-Wertes der Basensumme wurden die abgespaltenen Basen auf die Einwaage an trockenen Nukleinsäuren bezogen. Die G-Werte sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6: G-Wert für die Basensumme bei der Bestrahlung von Zellkernen bei 0°C und einer Dosisleistung von 9 Gy s^{-1} . G-Wert, bezüglich der Einwaage an trockenen Nukleinsäuren.

System	G(Basensumme)	
Zellkerne (Pellet)	Vakuum	0,44
Zellkerne (Pellet)	Sauerstoff	1,0
Zellkerne (trocken)	Vakuum	0,2
Zellkerne, zerstört	Vakuum	0,7
Zellkerne, zerstört	Sauerstoff	0,81

Es ergibt sich für die Bestrahlung der Zellkerne als Pellet ein Sauerstoffeffekt (OER) von ca. 2,3.

3.2. Isolierung veränderter Zucker und Zuckerendgruppen aus γ -bestrahlter DNA

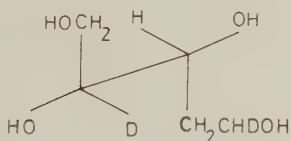
3.2.1. Bestrahlung von Kalbsthymus-DNA und Analyse der veränderten Zucker und alkalilabiler Stellen

Die Kalbsthymus - DNA wurde sowohl im trockenen als auch im angefeuchteten Zustand im Innenfeld der Co-60- γ -Quelle bei 0°C unter Sauerstoff bestrahlt. Es wurden Dosen von $1 \cdot 10^5$ bis $20 \cdot 10^5$ Gy angewandt, was bei der Dosisleistung von 9 Gy s^{-1} einer Bestrahlungszeit von 3 bis 70 Stunden entsprach.

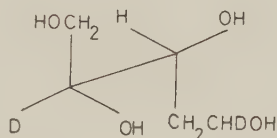
Wie in der Einleitung schon beschrieben, entstehen bei der γ -Bestrahlung von DNA in Lösung unter Anwesenheit von Sauerstoff ²⁵ die freien Zucker 3 und 7 und die noch an die DNA- Kette gebundenen veränderten Endgruppen 6a, 6b oder 6c sowie 8 ²⁶. Außerdem wurden die alkalilabilen Strukturen 9, 10a und 11 gefunden ^{26,28}.

In der vorliegenden Arbeit wurde bei der Bestrahlung der trockenen bzw. angefeuchteten DNA zur Identifizierung dieser niedermolekularen Bestrahlungsprodukte folgender Analysenweg beschritten:

Die bestrahlten und in Wasser aufgelösten DNA- Proben wurden mit Natriumbordeuterid reduziert. Die Reduktion mit NaBD_4 hat den Vorteil, daß die ursprünglich vorhandenen Carbonylgruppen durch Deuterierung markiert werden. Aus 2-Desoxypentos-4-ulose (3) entstehen durch Reduktion der Carbonylfunktion am C-4'- Atom die zwei stereoisomeren Polyalkohole 2-Desoxy-erythro-pentit-1,4- d_2 (13a) und 2-Desoxy-threo-pentit-1,4- d_2 (13b).

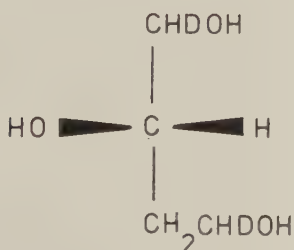


13a



13b

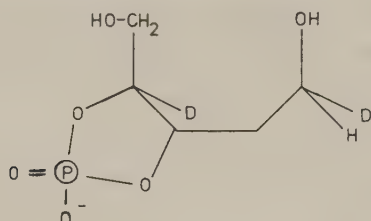
Die Reduktion von 2-Desoxytetrodialdose 7 führt zu 2-Desoxy-D,L-glycero-tetrir-1,4- d_2 (1,2,4-Butantriol-1,4- d_2)(14).



14

(L)

Die noch an die Kette gebundenen Bestrahlungsprodukte werden durch Reduktion wegen ihrer freien OH- Gruppen am C-4'- Atom in β -Stellung zu den Phosphorsäurediesterbindungen alkalilabil und können abhydrolysiert werden. Bei der Hydrolyse werden cyclische Phosphate als Übergangszustände gebildet, z.B.



Die Stabilität der Polyalkohole gegen Alkali wurde mit käuflichen Polyalkoholen überprüft. Dafür wurden die Polyalkohole unter verschiedenen Bedingungen mit Alkali behandelt und zur quantitativen Analyse silyliert und gaschromatographisch bestimmt. Tabelle 7 gibt die Anteile an Polyalkoholen in Prozent wieder, die nach der Hydrolyse mit Kalilauge oder gesättigter Bariumhydroxidlösung im Vergleich zur unbehandelten Probe noch vorhanden sind. Danach wurden die DNA- Proben 20 Stunden bei 37°C mit 0,3 M Kalilauge hydrolysiert.

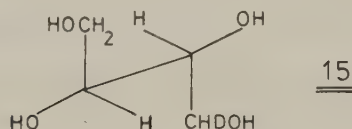
Die Polyalkoholphosphate wurden von der alkalischen Phosphatase (E.C. 3.1.3.1.), einer Phosphomonoesterase, die endständige Monophosphorsäureestergruppen als

Tabelle 7: Resistenz von Polyalkoholen gegen Alkali in %
bezüglich unbehandelte Vergleichsprobe nach
Silylierung und GC (Standardabweichung $\pm 10\%$)

	KOH (pH12,5 /20h)	KOH (pH13,7 /20h)		
	37°C	37°C	60°C	85°C
Erythrit	103	95	88	23
2-Desoxypentit	103	98	91	9
Ribit	100	99	72	6
Rhamnit	94	95	37	<1
Sorbit	86	72	16	<1
Ba(OH) ₂ (pH13 /20h)				
	37°C	60°C	85°C	
Erythrit	100	93	71	
2-Desoxypentit	102	94	74	
Ribit	92	84	24	
Rhamnit	96	67	29	
Sorbit	76	31	18	

anorganisches Phosphat entfernt, in Polyalkohole überführt. Die Inkubation erfolgte 16 Stunden bei pH 8 und 37°C.

Aus der 2,4-Diphosphaterythrose-Struktur der bestrahlten DNA 11 entsteht durch den beschriebenen Analysenweg meso-Erythrit-1-d₁ (15).



Vor der gaschromatographischen Analyse der Polyalkohole wurden diese durch eine Ultrafiltration von den größeren Oligonukleotiden und nicht abgebauten DNA abgetrennt. Das durch die vorangegangene Alkalibehandlung und anschließende Neutralisation angefallene Kaliumchlorid wurde in einigen Proben durch den Mischbettionenaustauscher Amberlite MB 2 entfernt, nachdem sichergestellt worden war, daß keine Verluste an Polyalkoholen durch Adsorption auftraten. Die Polyalkohole wurden zur gaschromatographischen Analyse in ihre Trimethylsilylether überführt und auf einer mit OV- 101 beschichteten Glaskapillarsäule aufgetrennt. Die einzelnen Produkte wurden durch Zuspritzen von den authentischen Substanzen zugeordnet.

Zur quantitativen Analyse wurde nach der Bestrahlung Ribose-5-phosphat als innerer Standard zugesetzt. Ribose-5-phosphat ist besonders geeignet, weil es außer der

Funktion als innerer Standard gleichzeitig reduziert und die Phosphatgruppe abgespalten werden muß, um in Ribit überführt zu werden, sich also einem den Bestrahlungsprodukten analogen Analysengang unterzieht. Als Response- Faktor für die Polyalkohole untereinander wurde 1,0 eingesetzt.

3.2.1.1. Dosiseffekte

Die Ausbeuten an Polyalkoholen nach dem oben beschriebenen Analysenverfahren sind in den Abbildungen 7,8 und 9 für die Bestrahlung von trockener DNA, DNA, die 26% Wasser enthielt und DNA mit 67% Wasser angegeben. Die Bestrahlung erfolgte unter Sauerstoff.

In Abbildung 10 ist die Abhängigkeit des G-Wertes von der Dosis im Falle der trocken bestrahlten DNA unter Sauerstoff aufgetragen.

Tabelle 8 zeigt eine Zusammenstellung für die initialen G-Werte der Polyalkohole für die verschieden bestrahlten DNA- Systeme.

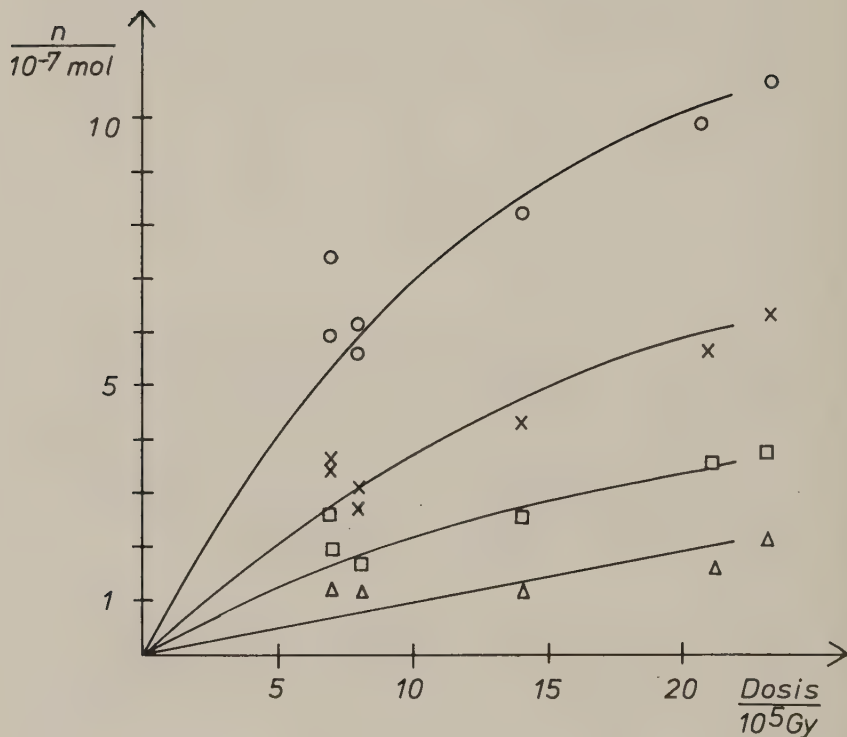


Abb. 7: Dosisabhängigkeit von Polyalkoholen bei der Bestrahlung von trockener DNA unter Sauerstoff bei 0°C (bezogen auf 100 mg trockene DNA)
Dosisleistung: 9 Gy s⁻¹
○ 2-Desoxy-erythro-pentit
× 2-Desoxy-threo-pentit
□ 1,2,4-Butantriol
Δ Erythrit

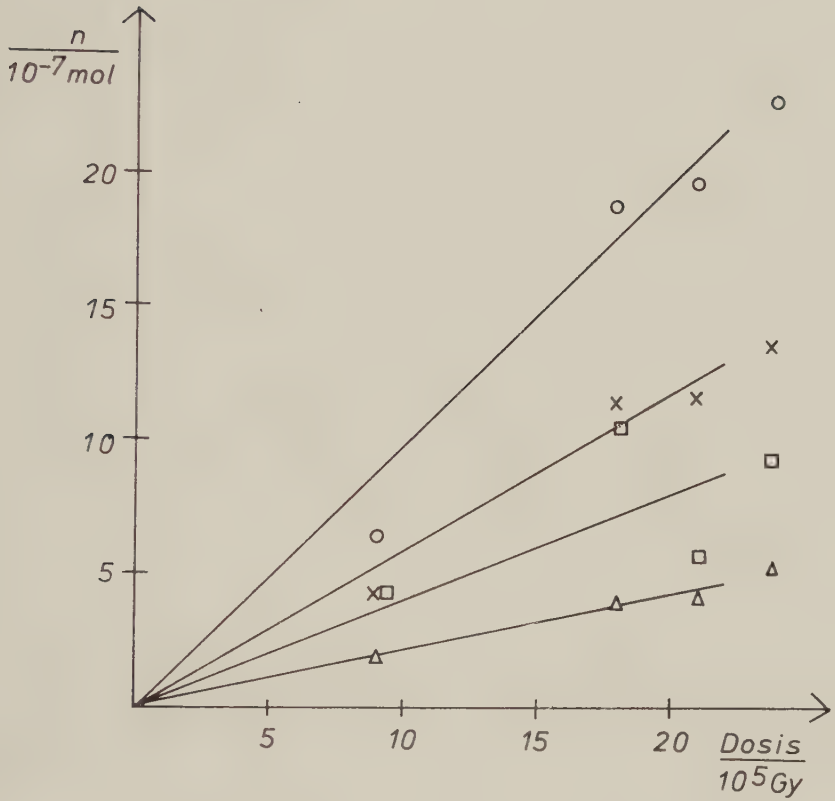


Abb. 8: Dosisabhängigkeit von Polyalkoholen bei der Bestrahlung von DNA / H₂O : 74% / 26% unter Sauerstoff bei 0°C (bezogen auf 100 mg trockene DNA) Dosisleistung: 9 Gy s⁻¹

○ 2-Desoxy-erythro-pentit

× 2-Desoxy-threo-pentit

□ 1,2,4-Butantriol

Δ Erythrit

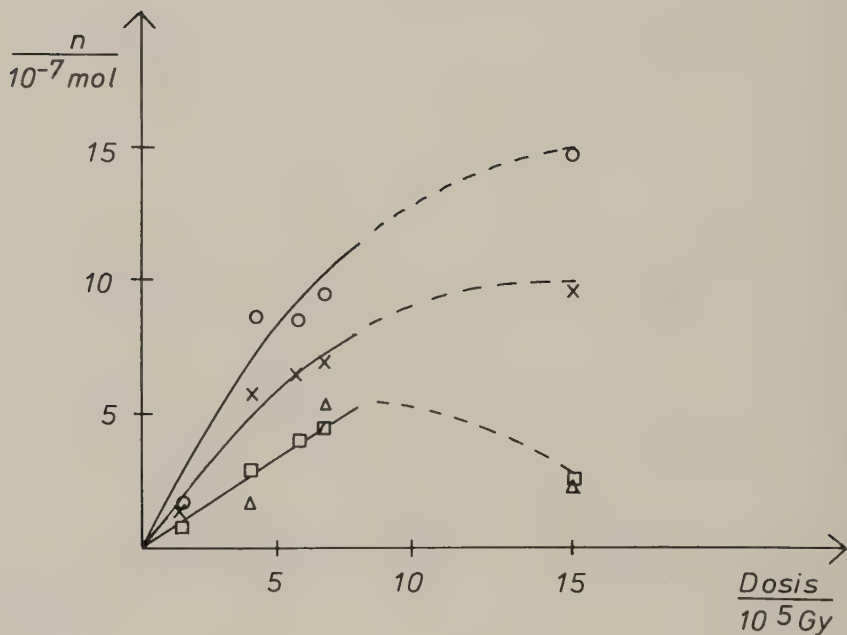


Abb. 9: Dosisabhängigkeit von Polyalkoholen bei der Bestrahlung von DNA / H_2O : 33% / 67% unter Sauerstoff bei 0°C (bezogen auf 100 mg trockene DNA) Dosisleistung: 9 Gy s^{-1}

○ 2-Desoxy-erythro-pentit

× 2-Desoxy-threo-pentit

□ 1,2,4-Butantriol

Δ Erythrit

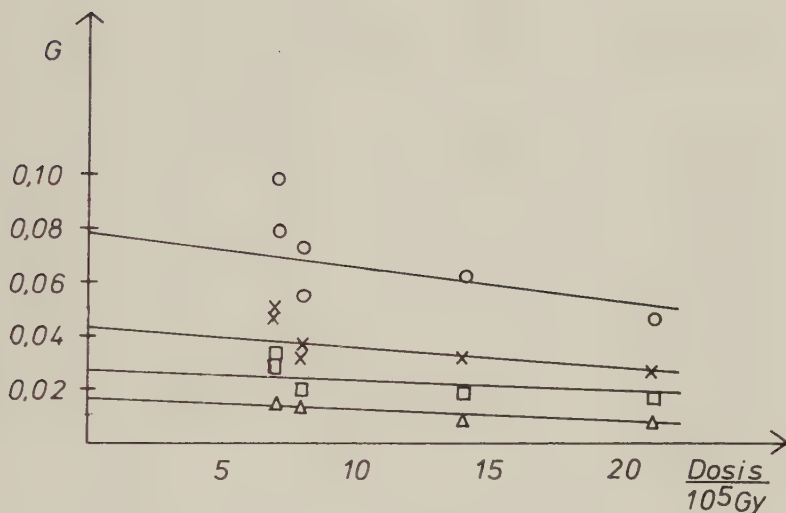


Abb. 10: G-Wert für die Isolierung von Polyalkoholen aus trocken bestrahlter DNA unter Sauerstoff bei 0°C in Abhängigkeit von der Dosis, G-Wert bezogen auf trockene DNA. Dosisleistung: 9 Gy s^{-1}

○ 2-Desoxy-erythro-pentit
 × 2-Desoxy-threo-pentit
 □ 1,2,4-Butantriol
 Δ Erythrit

Tabelle 8: Initialer G-Wert für die Polyalkohole bei der Bestrahlung von DNA unter

Sauerstoff bei 0°C. G-Wert, bezogen auf die Einwaage an trockener DNA.

Dosisleistung: 9 Gy s⁻¹ (a): trockene DNA, (b): DNA / H₂O : 74% / 26%,
(c): DNA / H₂O : 33% / 67%.

Vorläufer	Derivat	G(a)	G(b)	G(c)
2-Desoxypentos-4-ulose <u>2</u> , <u>6a</u> , <u>6b</u> , <u>6c</u>	2-Desoxy- <u>erythro</u> -pentit <u>12a</u>	0,078 Σ 0,12	0,095 Σ 0,15	0,14 Σ 0,24
2-Desoxypentos-4-ulose <u>2</u> , <u>6a</u> , <u>6b</u> , <u>6c</u>	2-Desoxy- <u>threo</u> -pentit <u>12b</u>	0,042	0,057	0,10
2-Desoxytetrodialdose <u>7</u> , <u>8</u>	1,2,4-Butantriol <u>14</u>	0,026	ca.0,039	0,06
Erythrose-2,4-diphos- phat <u>11</u>	Erythrit <u>15</u>	0,015	0,020	0,06

3.2.1.2. Identifizierung der Bestrahlungsprodukte durch GC-MS

Die gaschromatographisch analysierten Trimethylsilyl-
ether der Polyalkohole konnten wegen ihrer geringen
Menge und leichten Zersetzbarkeit nicht präparativ

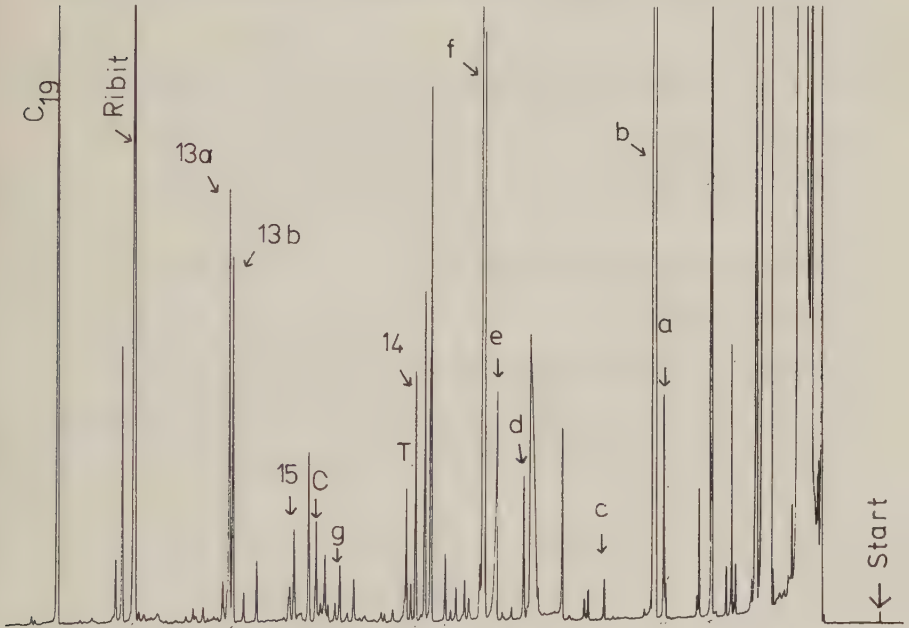


Abb. 11: Gaschromatogramm von γ -bestrahlter DNA / O₂ auf
OV-101. Zuordnung

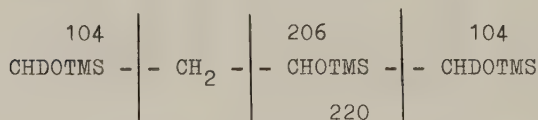
a: Milchsäure, b: Glykolsäure, c: 3-Hydroxypropionsäure,
d: 4-Hydroxybuttersäure, e: Phosphorsäure, f: Glycerin,
14: 1,2,4-Butantriol, T: Thymin, g: 2,3-Didesoxypentit,
C: Cytosin, 15: Erythrit, 13b: 2-Desoxy-threo-pentit
13a : 2-Desoxy-erythro-pentit

isoliert werden. Daher wurde für eine eindeutige Zuordnung der Produkte die instrumentelle Kombination aus Gaschromatographie und Massenspektrometrie gewählt. Abbildung 11 zeigt ein Gaschromatogramm, bei dem mit Hilfe von authentischem Material die erhaltenen Peaks zugeordnet worden sind.

Bei der γ -Bestrahlung von DNA unter Sauerstoff konnten folgende Produkte auf Grund ihrer in den Massenspektren auftretenden Spaltungen eindeutig zugeordnet werden:

2-Desoxy-D,L-glycero-tetrit-1,4-d₂ (1,2,4-Butantriol-1,4-d₂) (14):

Der aus den Bestrahlungsprodukten 7 und 8 auf die oben beschriebene Weise isolierte Alkohol 2-Desoxy-D,L-glycero-tetrit-1,4-d₂ hat nach der Trimethylsilylierung folgende Struktur:



Dieses Molekül zerfällt in die Fragmentationen m/e 309 (M - 15), 234 (M - 90), 220, 206 und 204, wobei letzteres die höchste Intensität aufweist. Die Intensitäten sind aus Abbildung 12 ersichtlich.

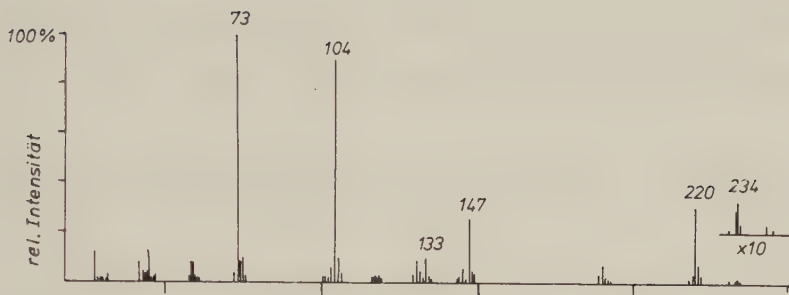
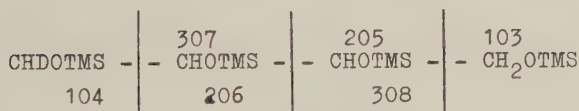


Abb. 12: Massenspektrum von 1,2,4-Butantriol-1,4-d₂

Meso-Erythrit-1-d₁ (15):

Die nach Reduktion und alkalischer Hydrolyse sowie Inkubation mit alkalischer Phosphatase abgebaute alkalilabile Stelle 11 wurde in ihr Trimethylsilylderivat überführt:

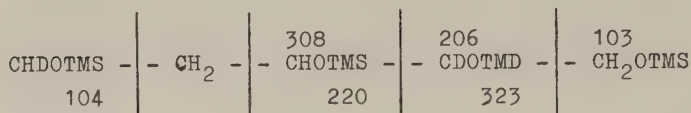


Dabei traten folgende Spaltionen auf:

m/e 308 (7%), 307 (6%), 321 (M - 90; 2%), 217 (M - 104 - 90; 27%), 205 (24%), 206 (19%) und 104 (1%).

2-Desoxy-erythro-pentit-1,4-d₂ (13a) und 2-Desoxy-threo-pentit-1,4-d₂ (13b):

Die TMS- Derivate dieser beiden Stereoisomeren sind durch GC-MS nicht zu unterscheiden:

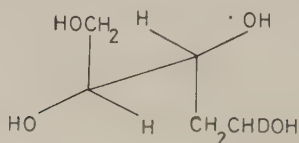
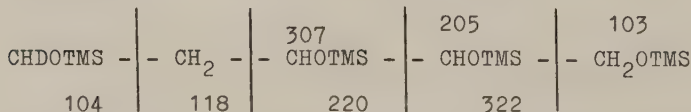


Das Pentit ist an den Stellen C-1' und C-4' deuteriert, was aus den auftretenden Spaltionen resultiert.

m/e 323 (1%), 321 (M - 15 - 90; 0,6%), 308 (3%), 246 (1%),
233 (M - 103; 3%), 220 (36%), 206 (7%), 104 (94%),
103 (9%).

2-Desoxy-D-erythro-pentit-1-d₁:

Im Produkt 9 ist die 2-Desoxyribose- Struktur noch vorhanden, aber die Base eliminiert. Diese alkalilabile Struktur wird nach der angewandten Analysenmethode in das 2-Desoxy-D-erythro-pentit-1-d₁-TMS-Derivat überführt:



2-Desoxy-D-erythro-pentit-1-d₁

Die Fragmentationen haben folgende Intensitäten:

m/e 322 (M - 103; 1,6%), 308 (4%), 232 (M - 103 - 90; 4%),
 245 (M - 90 - 90; 1%), 220 (43%), 205 (7%), und
 104 als höchster Peak (100%).

2-Desoxy-D-erythro-pentonsäure und -4d₁ :

Die silylierte Verbindung hat folgende Struktur



m/e deuteriert

424 (M - 15; <1%)

336 (M - 103; 2%)

306 (3%)

233 (4%)

218 (4%)

m/e undeuteriert

423 (M - 15; <1%)

348 (M - 90; <1%)

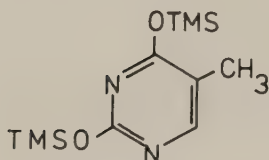
335 (M - 103) 2%)

305 (<1%)

217 (6%)

Thymin, Cytosin, Adenin:

Es waren die für die Trimethylsilylderivate der DNA-Basen ⁷² charakteristischen Fragmentionen gefunden worden:



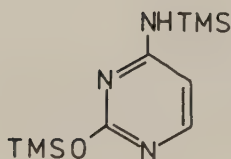
Thymin M (270)

m/e

270 (M; 40%)

255 (M - 15; 100%)

113 (40%)



Cytosin M (255)

m/e

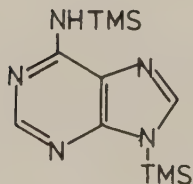
255 (M; 49%)

254 (83%)

240 (M - 15; 100%)

170 (26%)

98 (44%)



Adenin M (279)

m/e

279 (M; 25%)

264 (M - 15; 100%)

Außerdem wurden die für die Bestrahlung von DNA weniger charakteristischen Produkte gebildet:

Milchsäure und Milchsäure-2-d₁ (a):

Die undeuterierte Milchsäure hat ein Molekulargewicht von 234. Es traten Fragmentionen mit m/e 219 auf (M - 15) bzw. 220 für die deuterierte Verbindung; m/e 117 (und 118 bei Deuterierung) ferner m/e 191 (deuteriert 192) für M - 15 - 28.

Glykolsäure und Glykolsäure d₁ (d₂) (b):

Der Molekularpeak für die undeuterierte Glykolsäure von 220 trat nicht auf, dafür die folgenden Fragmentionen:

m/e undeuteriert	1d inkorporiert	2d inkorporiert	
205	206	207	(M - 15)
177	178	179	(M - 15 - 28)
161	162	163	(M - 15 - 44)

Der Deuterierungsgrad für die einfach deuterierte Verbindung betrug 50% und für die zweifach deuterierte 70%.

3-Hydroxypropionsäure (1d inkorporiert)(c):

Charakteristisch sind die Fragmentionen m/e 220 (M - 15) und 178 (M - 42).

4-Hydroxybuttersäure (d):

Auf Grund der Retentionszeiten von Hydroxybuttersäuren und der Fragmentionen m/e 233 (M - 15), 117 und 103 wurde 4-Hydroxybuttersäure identifiziert.

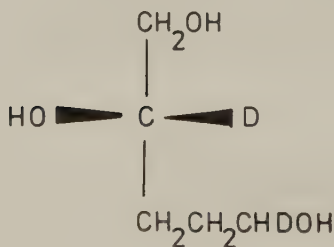
Glycerin (wenig Glycerin-1-d₁)(f):

Es traten die Fragmentionen m/e 103 und 205 auf, ebenso m/e 218 (M - 90) und 293 (M - 15). Ein geringer Anteil an m/e 104 und 206 bzw. 219 läßt auf einfache Deuterierung schließen.

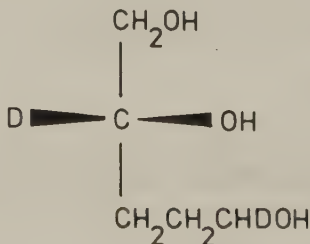
Außerdem wurde

2,3-Didesoxy-D,L-glycero-pentit-1,4-d₂ (g) identifiziert.

Der Vorläufer dieser Verbindung, 2,3-Didesoxypentos-4-ulose (2) ist bisher nur unter sauerstofffreien Bestrahlungen gefunden worden. Es wird angenommen, daß bei der Bestrahlung der DNA unter Sauerstoff - insbesondere bei hoher Dosis - das Sauerstoffangebot an der geschädigten DNA- Stelle partiell verarmt ist, sodaß es zur Ausbildung dieses Produktes in geringer Menge kommen konnte. (g)



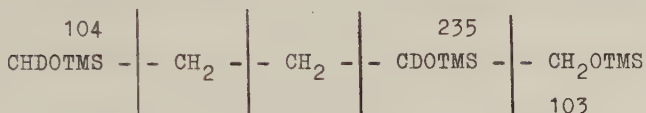
(L)



(D)

2,3-Didesoxy-D,L-glycero-pentit-1,4-d₂

In der silylierten Verbindung traten besonders die Fragmentionen m/e 145 (M - 103 - 90; 54%) und 235 (M - 15; 5%) hervor.



3.2.2. Bestimmung des molekularen Wasserstoffs

Getrocknete DNA wurde in einem Bestrahlungsgefäß evakuiert und 30 Minuten mit Argon gespült. Der durch die γ -Bestrahlung bei 0°C entstandene molekulare Wasserstoff konnte gaschromatographisch bestimmt werden. Als Säule diente ein Molekularsieb der Korngröße 5 Å, der Detektor war ein Wärmeleitfähigkeitsdetektor. Der G-Wert betrug $G(\text{H}_2) = 0,08$, bezogen auf trockene DNA.

3.3. Molekulargewichtsbestimmung

Für die Bestimmung des Molekulargewichts von γ -bestrahlter DNA ist als Absolutmethode die Streulichtmessung geeignet ⁷³. Die gemessene Streulichtintensität gibt die Summe der Streuintensitäten aller vorhandenen Makromoleküle wieder.

Zur Bestimmung des Molekulargewichts wurde das Verhältnis der relativen Streulichtintensitäten G_θ/G_0 in einem Kleinwinkel- Laser- Lichtstreuophotometer KMX-6 bei einem Winkel θ von $6 - 7^\circ$ gemessen. Dabei ist G_θ die Streulichtintensität und G_0 die Intensität des durchgehenden Laserlichts. Der Rayleighfaktor R_θ berechnet sich aus:

$$R_\theta = \frac{G_\theta}{G_0} \cdot D \cdot (\sigma' l')^{-1}$$

Hierbei steht D für die Transmission der Abschwächerkombination der eingesetzten Filter. σ' und l' sind Raumwinkel und Länge des Streuvolumens, beide korrigiert für den Brechungsindex des Lösungsmittels. Das Produkt $(\sigma' l')^{-1}$ ist eine Instrumentengröße.

$$(\sigma' l')^{-1} = 8,7807 \cdot 10^2 \text{ cm}^{-1}$$

Der Rayleighfaktor $\overline{R_\theta}$ der Probe ist gleich dem Rayleighfaktor der Lösung R_θ , vermindert um den Rayleighfaktor R_0

für das Lösungsmittel.

$$\overline{R_{\theta}} = R_{\theta, \text{Lösung}} - R_{\theta, \text{Lösungsmittel}}$$

Die Grundgleichung für die Bestimmung des Molekulargewichts lautet:

$$\frac{K c}{R_{\theta}} = \frac{1}{M_w} + 2A_2 c$$

K ist für das Gerät eine optische Konstante und enthält alle Geräteparameter. Da die eingesetzten DNA- Konzentrationen sehr klein sind, wird der Brechungsindex der Lösung gleich dem des Lösungsmittels gesetzt. Für diesen Konzentrationsbereich bleibt K eine Konstante.

$$K = 4,079 \cdot 10^{-6} \cdot n^2 \cdot \left(\frac{dn}{dc} \right)^2$$

M_w : Gewichtsmittel des Molekulargewichts

A_2 : 2. Virialkoeffizient

c : Konzentration in g ml^{-1}

n : Brechungsindex für 0,5 M KCl = 1,338

$\frac{dn}{dc}$: spezielles Brechungsindexinkrement für Kalbsthymus-

DNA = 0,116 ml g^{-1} Lit 74,75

Es wurden R_{θ} - Werte für 5 bis 6 verschieden konzentrierte DNA- Lösungen (1 - 100 $\mu\text{g/ml}$) gemessen. Trägt man den aus den gemessenen Daten errechneten Wert für $\frac{K c}{R_{\theta}}$ gegen die Konzentration auf und extrapoliert nach $c = 0$, so erhält man das reziproke Molekulargewicht.

Die Bestrahlung wurde mit getrockneter DNA unter Sauerstoff bei 0°C mit verschiedenen Dosen durchgeführt. Nach der Bestrahlung wurde die DNA in 0,5 M Salzlösung gelöst, um die Doppelhelixnatur der DNA zu erhalten. Es wurden Schmelzpunktkurven aufgenommen, um aus der sogenannten Hyperchromizität Rückschlüsse auf die Nativität der DNA zu ziehen. Bei dieser thermischen Denaturierung kam es nach einem sprunghaften Extinktionsanstieg zu einem gesamten Extinktionsanstieg von 32%, was den Eigenschaften der nativen DNA entsprach. Abbildung 13 zeigt eine solche Schmelzpunktkurve. Der Schmelzpunkt T_m lag bei 95°C.

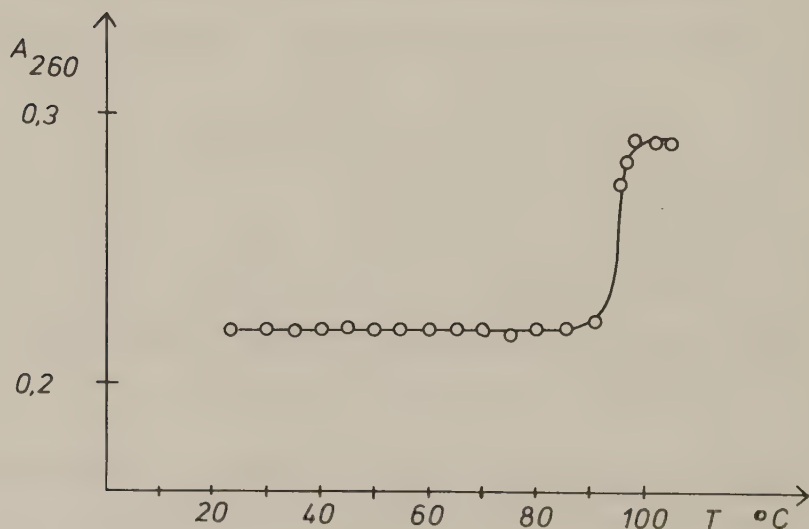


Abb. 13: Schmelzpunktkurve von γ -bestrahlter DNA unter Sauerstoff bei 0°C.

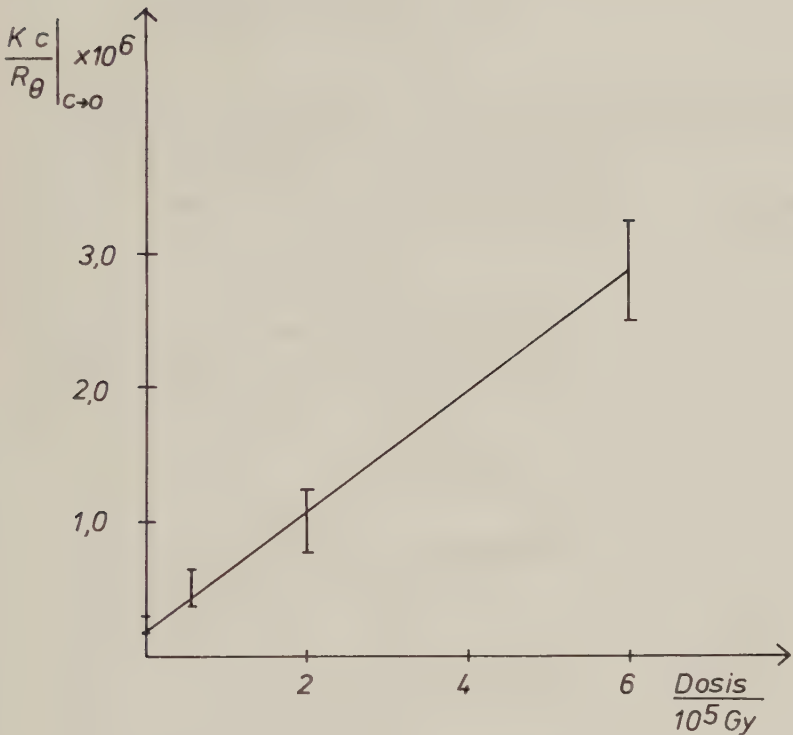


Abb. 14: Dosisabhängigkeit des Ausdrucks $\frac{Kc}{R_\theta}$ bei der Bestrahlung von trockener DNA unter Sauerstoff bei 0°C. Dosisleistung 9 Gy s^{-1}

Durch die Streulichtmessung erhält man das Gewichtsmittel des Molekulargewichts. In Abbildung 14 ist der Reziprokwert des Molekulargewichts, $\frac{Kc}{R_\theta}$, gegen die Dosis

aufgetragen. Die durchschnittliche Zahl an Brüchen pro Molekül gibt folgende Gleichung an:

$$dsb = \frac{\text{Molekulargewicht (Anfang)}}{\text{Molekulargewicht (Ende)}} - 1$$

Das Molekulargewicht M (Anfang) betrug $5 \cdot 10^6 \text{ g mol}^{-1}$ für die unbestrahlte DNA, und für das Molekulargewicht nach einer Bestrahlungsdosis von $6 \cdot 10^5 \text{ Gy}$ ergab sich M (Ende) $3,45 \cdot 10^5 \text{ g mol}^{-1}$.

Für eine Zufallsverteilung von Brüchen in einem Molekül, die man bei mehr als fünf Brüchen pro Molekül zu erwarten hat, gilt ⁷⁶:

$$2 M_n = M_w$$

Dabei ist M_n , das Zahlenmittel des Molekulargewichts, halb so groß wie das Gewichtsmittel. Die Zahl der Doppelstrangbrüche betrug 27.

$$\begin{aligned} 1 \text{ Mol DNA (unbestrahlt)} &\hat{=} 5 \cdot 10^6 \text{ g} \\ 1 \text{ g DNA} &\hat{=} 2 \cdot 10^{-7} \text{ Mol} \hat{=} 1,2 \cdot 10^{17} \text{ Moleküle} \end{aligned}$$

Bei 27 Doppelstrangbrüchen pro Molekül ergibt sich $3,24 \cdot 10^{18}$ dsb pro g DNA. Wie aus Abbildung 14 zu erkennen ist, steigt der Ausdruck $\frac{K}{R \cdot \theta}$, der der Zahl der Doppelstrangbrüche proportional ist, linear mit der Dosis an. Der G-Wert beträgt demnach

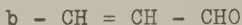
$$G(dsb) = \frac{3,24 \cdot 10^{18} \cdot 100}{6 \cdot 10^7 \cdot 6,24 \cdot 10^{13}} = \underline{\underline{0,09}}$$

3.4. 2-Thiobarbitursäure- Test auf Bestrahlungs- produkte

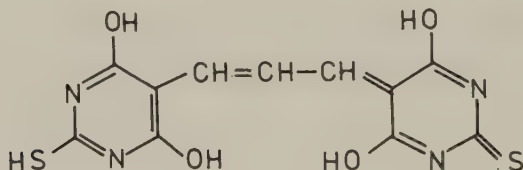
Ein Strahlenschaden an der Desoxyriboseeinheit der DNA, der durch γ -Bestrahlung von wäßrigen Lösungen hervorgerufen wird, ist von Krushinskaya und Shal'nov ⁷⁷ als Malondialdehyd (MA) angegeben und über dessen Chromophor mit 2-Thiobarbitursäure bestimmt worden. Der G-Wert für Malondialdehyd beträgt hiernach $G(\text{MA}) = 0,1$. Die Autoren nehmen an, daß MA durch Spaltung der Desoxyriboseeinheit aus den C- Atomen C-1' bis C-3' entstanden ist. Kapp und Smith ⁴⁴ haben dagegen zeigen können, daß bei der γ -Bestrahlung unter Luft kein freier Malondialdehyd entsteht, sondern der Chromophor mit 2-Thiobarbitursäure mit makromolekularer DNA ausfällbar ist. Erst die sauren Reaktionsbedingungen, sowie Erhitzen und die Anwesenheit von Thiobarbitursäure führen nach ihrer Meinung zur Freisetzung von Malondialdehyd, der dann den Chromophor bilden kann. Sie haben einen G-Wert von $G(\text{MA}) = 0,24$ gefunden.

In neueren Untersuchungen von Giloni et al. ⁷⁸ mit Bleomycin- behandelter DNA - Bleomycin setzt Strangbrüche in der DNA - sind UV- absorbierende niedermolekulare Komponenten beschrieben worden, die mit 2-Thiobarbitursäure einen Chromophor bilden. Sie deuten

diese Produkte als Basenpropenale, und damit



als Fragmente, die aus Basen und C-1' bis C-3'- Atomen der Desoxyriboseeinheit bestehen und die von der Kette abgespalten worden sind. Burger et al.⁷⁹ beschreiben eine "malonaldehydähnliche" Komponente, die mit der makromolekularen DNA ausfällbar ist und deren Hydrolyse und anschließende Reaktion mit 2-Thiobarbitursäure ein Produkt liefert, das vom authentischen Malondialdehyd-Thiobarbitursäure- Addukt nicht zu unterscheiden ist. Sie schreiben dem Chromophor folgende Struktur zu, die aufgrund von spektroskopischen und ¹H NMR- Untersuchungen identifiziert worden ist:



In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob Produkte wie Malondialdehyd oder Basenpropenale bei der γ -Bestrahlung von trockener oder angefeuchteter DNA entstehen. Dazu wurde die Reaktion mit 0,6%- iger wäßriger 2-Thiobarbitursäurelösung bei einem pH von 2 und 15- minütigem Erhitzen auf 100°C durchgeführt. Der durch saure Hydrolyse entstandenen MA lieferte mit Thiobarbitursäure einen Farbstoff mit dem molekularen Extinktionskoeffizienten von $1,46 \cdot 10^5 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ und einem Absorptionsmaximum von

532 nm. Die bestrahlte und in Wasser gelöste DNA bildete mit 2-Thiobarbitursäure außer dem Absorptionsmaximum bei 532 nm noch zwei weitere Maxima, bei 496 nm und 455 nm. Die letzten beiden wurden aber auch bei unbestrahlter DNA beobachtet, sie stellen also keine Addukte von Bestrahlungsprodukten dar.

3.4.1. Dosiseffekte

Die Bestrahlung erfolgte sowohl im Vakuum als auch unter Sauerstoff mit trockener, angefeuchteter und mit Radikal-fängern versetzter DNA.

Abbildung 15 zeigt die Abhängigkeit der Bildung des Chromophors mit Thiobarbitursäure von der Dosis bei der Bestrahlung von trockener DNA, bezogen auf die Einwaage an trockener DNA. Während der G-Wert bei der unter Vakuum bestrahlten DNA konstant bleibt, fällt der G-Wert bei der unter Sauerstoff bestrahlten DNA bis zu einer Dosis von $2,5 \cdot 10^5$ Gy leicht ab und bleibt im höheren Dosisbereich konstant. Der auf die Dosis Null extrapolierte initiale G-Wert liegt zwischen 0,14 und 0,17, bezüglich trockener DNA- Einwaage.

In Abbildung 16 ist die Dosisabhängigkeit des Chromophors für die Bestrahlung von DNA / H₂O : 33% / 67% aufgetragen. Hier führt die Bestrahlung unter Sauerstoff zu einer stetigen Abnahme des G-Wertes. Die Bestrahlung

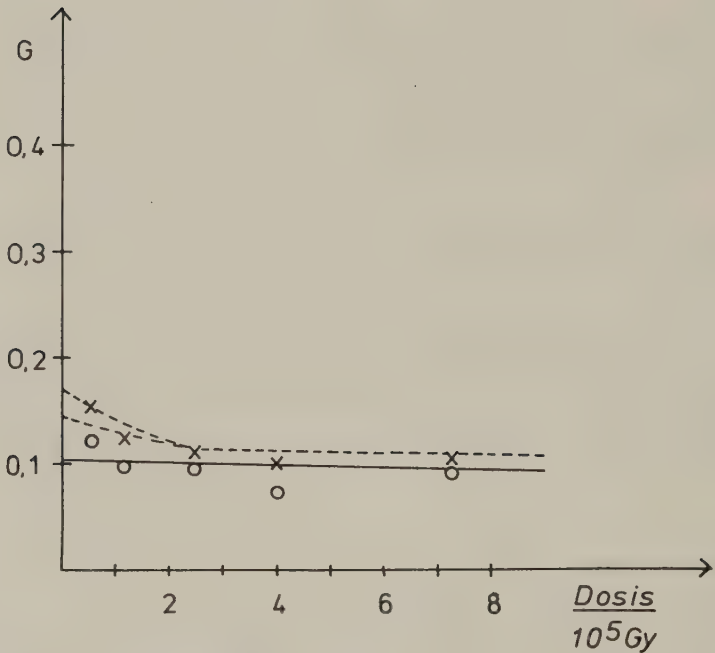


Abb. 15: G-Wert für die Bildung des TBA- Chromophors bei der γ -Bestrahlung von trockener DNA bei 0°C in Abhängigkeit von der Dosis, G-Wert bezogen auf trockene DNA. Dosisleistung: 9 Gy s^{-1}
O Bestrahlung im Vakuum
X Bestrahlung unter Sauerstoff

wurde in diesem Fall auch bei geringeren Dosisleistungen von $2,6 \text{ Gy s}^{-1}$ und $1,3 \text{ Gy s}^{-1}$ durchgeführt. Der initiale G-Wert beträgt $G(\text{Chromophor}) = 0,7$, er fällt bei einer absorbierten Dosis von $4 \cdot 10^5 \text{ Gy}$ bis auf $0,4$ ab (Abb. 16).

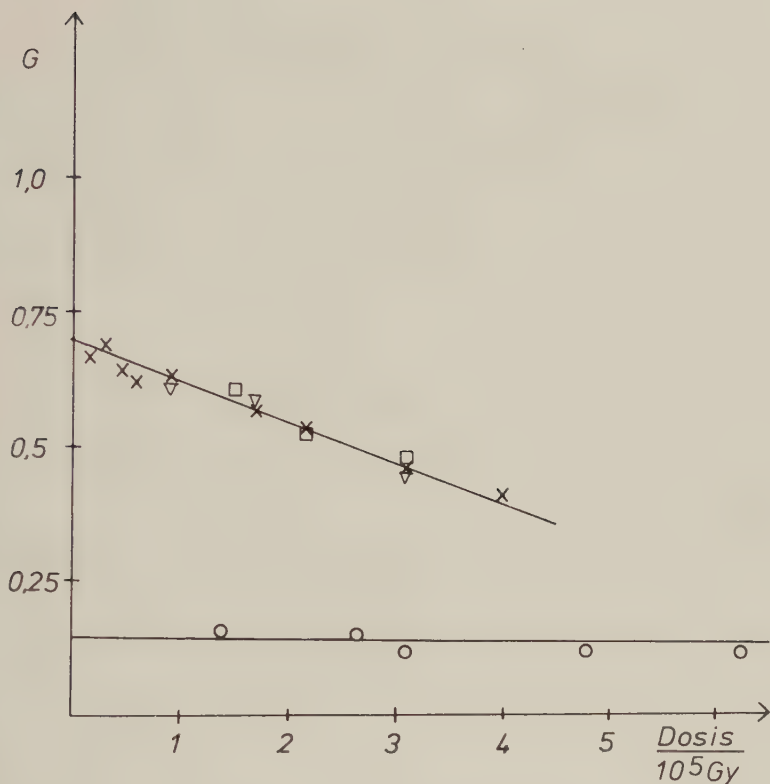


Abb. 16: G-Wert für die Bildung des TBA- Chromophors bei der Bestrahlung von DNA / H_2O : 33% / 67% bei 0°C in Abhängigkeit von der Dosis, G-Wert bezogen auf trockene DNA. D_L = Dosisleistung

○ Bestrahlung im Vakuum, $D_L = 9 \text{ Gy s}^{-1}$

× Bestrahlung unter Sauerstoff, $D_L = 9 \text{ Gy s}^{-1}$

□ $2,6 \text{ Gy s}^{-1}$ und ▽ $1,3 \text{ Gy s}^{-1}$.

Schließlich sind aus den Abbildungen 17 und 18 die Dosisabhängigkeiten der Bildung des TBA- Chromophors für die γ -Bestrahlungen der DNA mit Methanol- bzw. tert. Butanolzusatz ersichtlich. Der G-Wert im tert. Butanol-system sinkt in Anwesenheit von Sauerstoff vom initialen G-Wert 0,34 auf 0,22 ab einer absorbierten Dosis von $2,5 \cdot 10^5$ Gy.

Einen Überblick über die für die einzelnen Systeme erhaltenen G-Werte gibt Tabelle 9. Da der Chromophor mit TBA aus γ -bestrahlter DNA das gleiche Absorptionsmaximum (532 nm) wie der Chromophor mit TBA aus freiem Malondialdehyd besaß, wurde für die Berechnung des G-Wertes ($G(\text{Chromophor})$) der Extinktionskoeffizient des MA- TBA- Chromophors zugrunde gelegt.

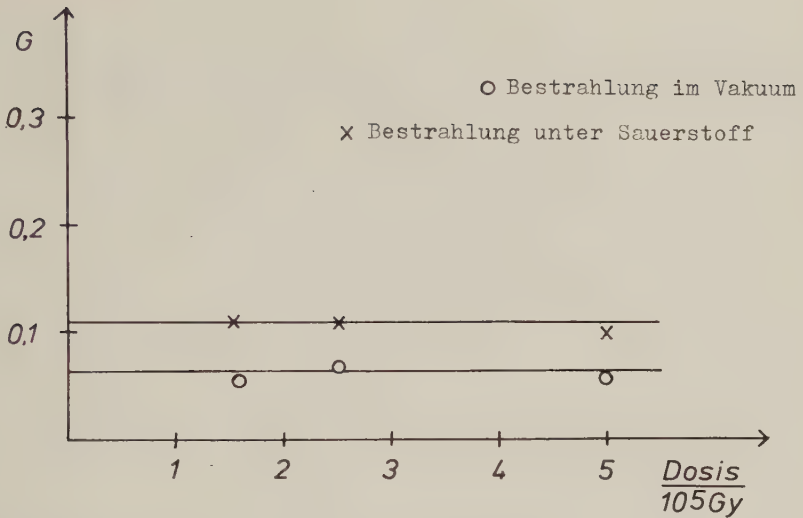


Abb.17: G-Wert für die Bildung des Chromophors mit TBA bei der Bestrahlung von DNA / H_2O / MeOH : 36% / 36% / 28% bei $0^\circ C$ in Abhängigkeit von der Dosis, G-Wert, bezogen auf trockene DNA. Dosisleistung:

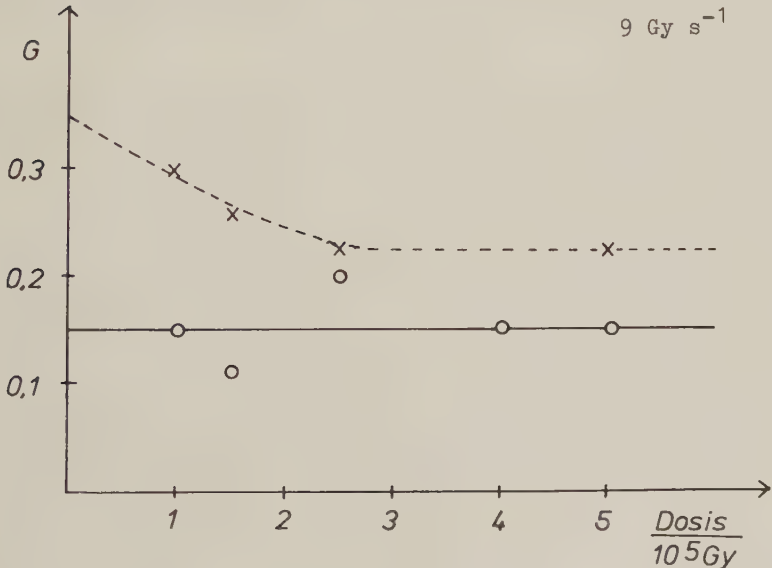


Abb. 18: wie Abb.17, System DNA/ H_2O /t-BuOH: 36% / 36% / 28%

Tabelle 9: G-Wert für die Bildung des Chromophors mit
2-Thiobarbitursäure aus γ -Bestrahlter DNA
bei 0°C, bezogen auf die Einwaage an trockener
DNA. Dosisleistung: 9 Gy s⁻¹.
* Initiale G-Werte, auf Dosis 0 extrapoliert
(Angaben in Gewichtsprozent)

Bestrahlung im <u>Vakuum</u>	G(Chromophor)
DNA (trocken)	0,10
DNA / H ₂ O : 33% / 67%	0,15
DNA / H ₂ O / MeOH :	0,065
36% / 36% / 28%	
DNA / H ₂ O / t-BuOH :	0,15
36% / 36% / 28%	
Bestrahlung unter <u>Sauerstoff</u>	
DNA (trocken)	0,14 - 0,17 *
DNA / H ₂ O : 33% / 67%	0,70 *
DNA / H ₂ O / MeOH :	0,11
36% / 36% / 28%	
DNA / H ₂ O / t-BuOH :	0,34 *
36% / 36% / 28%	

3.4.2. Dünnschichtchromatographie

Zur Untersuchung des freien Malondialdehyds oder der freien Basenpropenale wurden die bestrahlten Proben in Wasser gelöst und auf Kieselgel 60 F₂₅₄- Dünnschichtplatten aufgetragen. Es ergaben sich für das Fließmittel (2) folgende R_F - Werte: Thymin 0,5; Malondialdehyd 0,3; Adenin 0,22; Guanin 0,13; Cytosin 0,07. Nukleotide blieben am Start ($R_F = 0$). Im Gegensatz zu Giloni et al. ⁷⁸ wurden außer den Basen keine weiteren UV- absorbierenden Substanzen gefunden. Mit 2-Thiobarbitursäure ließ sich nur der Fleck am Start rot anfärben. Auch durch vorherige Extraktion mit Methanol konnten keine freien Basenpropenale oder Malonaldehyd nachgewiesen werden.

3.4.3. Säulenchromatographie an Sephadex A 25

Die bestrahlten Probelösungen wurden wie für die Isolierung der Basen auf einer Sephadex A 25- Anionenaustauschersäule aufgetrennt. Der Thiobarbitursäurenachweis für die Basenfraktion verlief negativ. In der Nukleotidfraktion ließen sich nur 21% des gebildeten Chromophors nach dem Einengen der Fraktion zurückgewinnen.

3.4.4. Gelchromatographie an Sephadex G 10

Analog zu der Säulenchromatographie von Burger et al.⁷⁹ wurden die Proben auf eine mit Sephadex G 10 beschichtete Säule aufgetragen und eluiert. Es wurden folgende Fraktionen erhalten:

45 - 110 ml Nukleotide	
110 - 150 ml Thymin	
150 - 300 ml Cytosin	
300 - 480 ml Cytosin und Adenin	] nicht getrennt
70 - 140 ml Malondialdehyd	

In der Nukleotidfraktion wurden 82% des die TBA- Reaktion gebenden Chromophors nachgewiesen. Alle anderen Fraktionen lieferten insgesamt 6%.

Wurden die bestrahlten Proben vor der Gelchromatographie einer zehnminütigen Inkubation auf 50°C unterworfen, so fanden sich immer noch 79% des Chromophors in der Nukleotidfraktion. Diese Verschiebung von 3% zu den niedermolekularen Fraktionen hin war nicht signifikant. Es konnten also im Gegensatz zu dem Ergebnissen von Burger et al.⁷⁹ keine UV- absorbierenden und den Chromophor bildenden Komponenten durch Hitzeeinwirkung freigesetzt werden.

3.4.5. Hydrolyse der Bestrahlungsprodukte und Sedimentation

Einen weiteren Beweis für den Befund, daß die Bestrahlungsprodukte, die mit Thiobarbitursäure den Chromophor bildeten, an die DNA- Kette gebunden waren, konnte man durch Ausfällen der DNA mit Ethanol erhalten. Dabei wurden 80% der Chromophoraktivität im Sediment gefunden, während 19% im Überstand nachgewiesen werden konnten. Für diesen Versuch durfte die DNA nur mit der geringen Dosis von $1 \cdot 10^4$ Gy bestrahlt werden, damit sie nicht zu stark degradiert wurde und noch ausfällbar blieb.

Wurde die bestrahlte DNA vor der Fällung mit Ethanol bei pH- Werten von 2,7 bis 12,3 - 10 Minuten bei 90°C inkubiert, so erhielt man die Verteilung an chromogener Substanz im Sediment und im Überstand, die in Abbildung 19 wiedergegeben ist. Die Absorption des TBA- Chromophors wurde auf die unbehandelte Probe ($\hat{=}$ 100%) bezogen. Der Anteil der Chromophoraktivität im Sediment nahm vom neutralen zum sauren pH- Bereich hin ab, während der Anteil im Überstand anstieg. Für die Summe aus Sediment und Überstand wurde bei einem pH- Wert von 2,7 noch 72% der Chromophoraktivität gemessen. Es muß ergänzt werden, daß die Lösungen des Überstands zur Entfernung des Ethanols von der Fällung am Rotationsverdampfer bis zur Trockne einrotiert worden sind. Freier

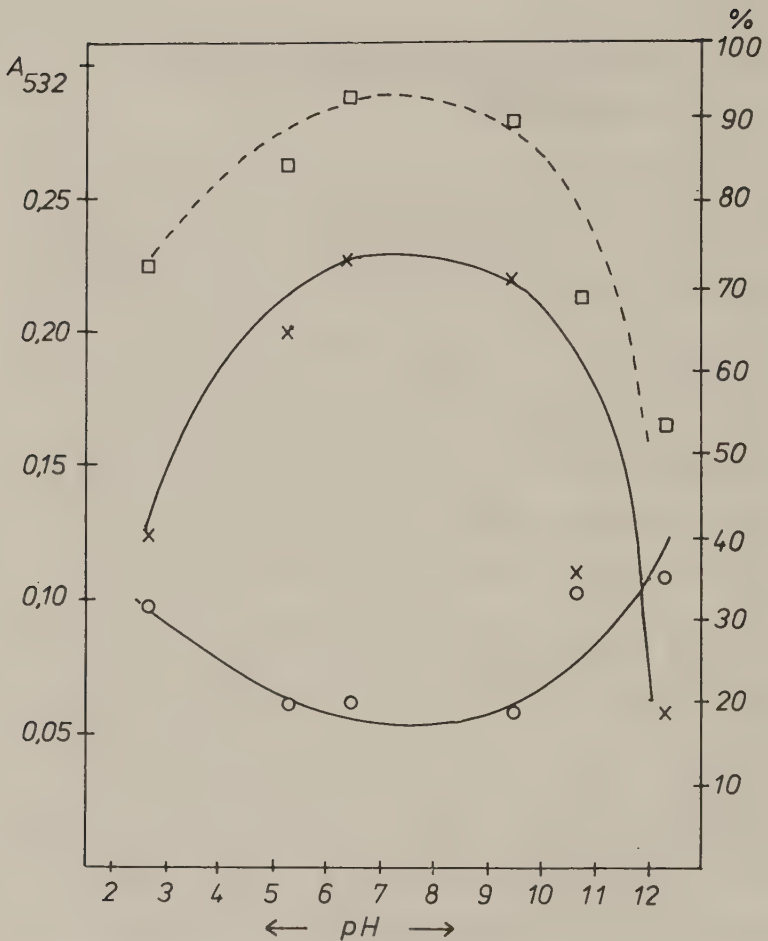


Abb. 19: Inkubation der bestrahlten Probe (DNA / H₂O : 33% / 67%; 0°C / O₂) bei 90°C / 10 min und anschließende Sedimentation mit EtOH. Abhängigkeit der Absorption des TBA- Chromophors vom pH- Wert, bezogen auf die unbehandelte Probe $\hat{=}$ 100%. x Sediment, o Überstand der EtOH-Fällung ; □ Summe aus x und o

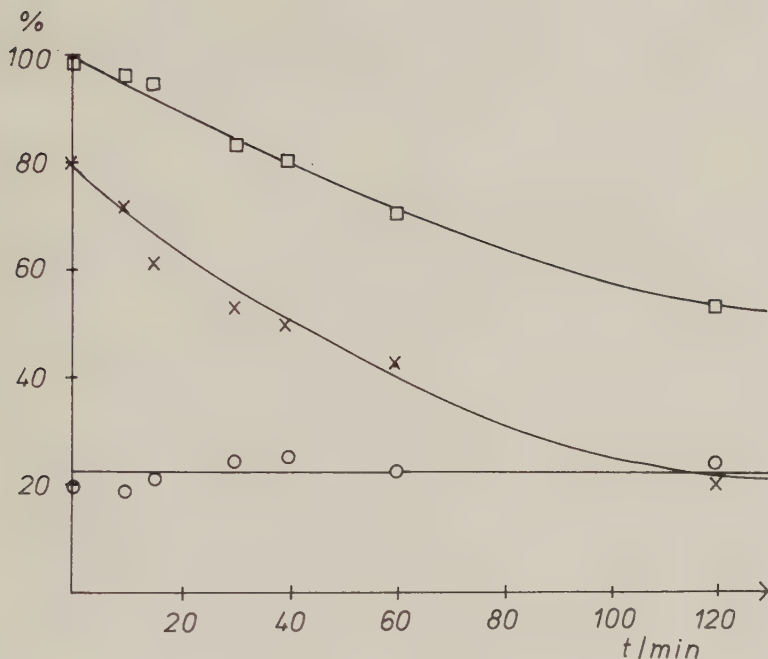


Abb. 20: Inkubation der 1. EtOH- Fällung der bestrahlten Probe (DNA / H₂O: 33% / 67%; 0°C/ O₂) bei 90°C, pH 6,3. Abhängigkeit des TBA- Chromophors von der Inkubationszeit. Chromophorbildung im
 □ Hydrolysate; × Sediment nach 2. EtOH- Fällung;
 ○ Überstand nach 2. EtOH- Fällung

Malondialdehyd ist in saurer und neutraler konzentrierter Lösung nicht beständig und kann daraus nicht in fester Form gewonnen werden. In alkalischer Lösung ist Malonaldehyd dagegen beständig. Durch die Inkubation bei

höheren pH- Werten fiel die Ausbeute an chromogener Substanz aber nach Abbildung 19 stark ab, was dem Verhalten von freiem Malondialdehyd widerspricht.

In einer anderen Versuchsreihe wurden die Sedimente der Alkoholfällung 0 bis 120 Minuten lang bei pH 6,3 auf 90°C erhitzt und erneut mit Ethanol ausgefällt. Wie Abbildung 20 zeigt, bleibt der Anteil an chromogener Substanz, der sich im Überstand befindet, konstant, während der Anteil im Sediment mit zunehmender Inkubationszeit abnimmt. Zusätzlich wurde der TBA- Chromophor direkt aus dem Hydrolysat bestimmt, um eventuelle Verluste, die durch Einengen der Probelösung entstehen könnten, auszuschließen. Auch hier fiel der Anteil mit zunehmender Inkubationszeit ab. Bei anderen Proben, deren Sedimente der 1. EtOH- Fällung 15 Minuten bei pH 2,2 und 100°C inkubiert wurden, setzten sich nach der 2. EtOH- Fällung die Anteile an chromophorbildender Substanz wie folgt zusammen: Im Hydrolysat wurden 93% gefunden, im Überstand 59% und im Sediment 15%. Die Differenz zwischen dem Wert des Hydrolysats (93%) und der Summe aus Überstand und Sediment (74%) macht 19% aus und entspricht damit dem Anteil an Malondialdehyd, der durch saure Hydrolyse freigesetzt wird. (Zur Bestimmung des Chromophors mußte der Überstand eingeengt werden, wodurch freier Malondialdehyd quantitativ entfernt werden konnte.)

3.4.6. Kinetik der Bestrahlungsprodukte für die
Reaktion mit 2-Thiobarbitursäure

Die Bildungsgeschwindigkeit für den Chromophor der Bestrahlungsprodukte mit 2-Thiobarbitursäure wurde am γ -betrahlten System DNA / H_2O : 33% / 67% in Anwesenheit von Sauerstoff untersucht. Dazu wurden die bestrahlten Proben in Wasser gelöst, 1 bis 20 Minuten auf 100°C mit Thiobarbitursäure erhitzt und anschließend die Reaktion durch Wiskühlung abgebrochen. Die Absorptionen wurden dann bei 532 nm gemessen. Einen Vergleich der bestrahlten Proben mit der Bildungsgeschwindigkeit des Chromophors bei freiem Malondialdehyd zeigt Abbildung 21. Die Kurve, die bei freiem Malonaldehyd erhalten wird (Abb. 21 a), verläuft im Anfangsbereich steiler als bei der bestrahlten Probe. Zusätzlich wurde eine bestrahlte Probe bei pH 2,5 hydrolysiert. Für die Bildung von jeweils 50% des Chromophors konnten folgende Zeiten ermittelt werden:

freier Malondialdehyd	: 2,0 min (Abb.21a)
γ -bestrahlte DNA / O_2	: 3,4 min (Abb.21b)
γ -bestrahlte DNA (pH 2,5)/ O_2	: 3,2 min

Auch diese letzten beiden Werte sprechen gegen die Bildung von ausschließlich freiem Malondialdehyd bei der γ -Bestrahlung von DNA.

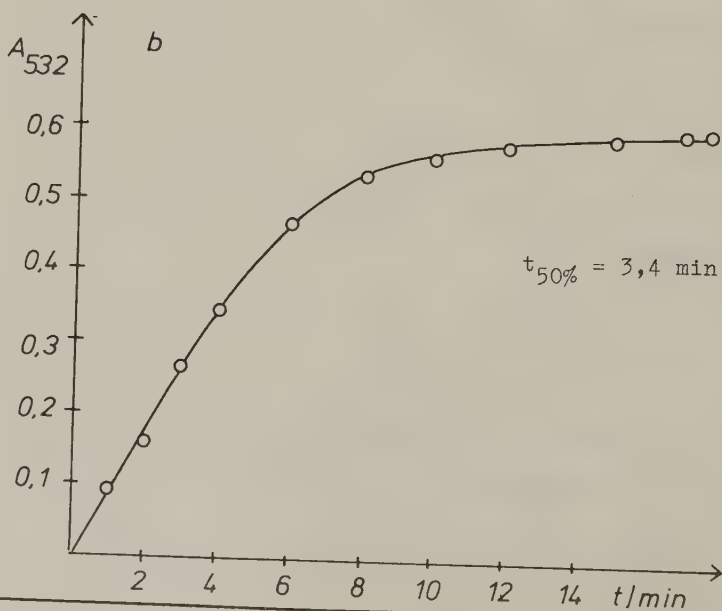
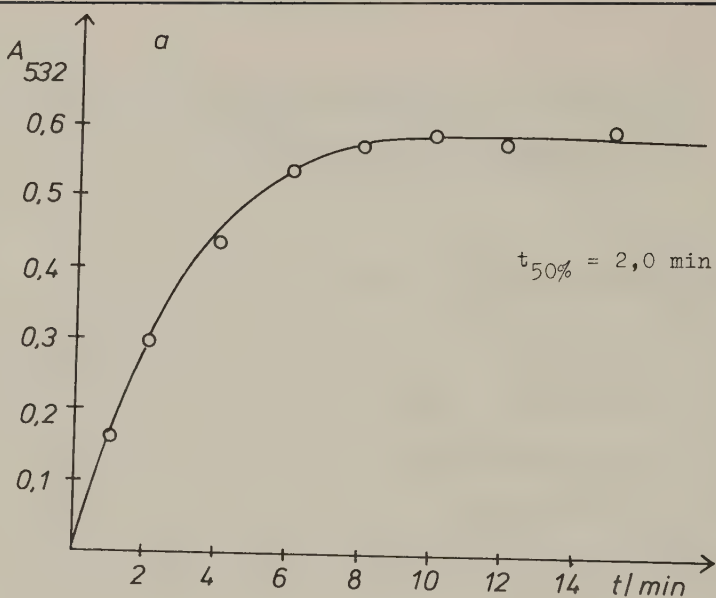


Abb. 21: Bildungsgeschwindigkeit für 50% des TBA- Chromo-
phors bei 100°C a: mit Malonaldehyd, b: mit
bestrahlter DNA / H₂O : 33% / 67% / O₂

IV DISKUSSION

4.1. Basenabspaltung bei der γ -Bestrahlung von DNA

In der vorliegenden Arbeit wurden erstmals die durch die γ -Bestrahlung von fester DNA unveränderten abgespaltenen Basen bestimmt. Bisher sind solche Basenfreisetzungen nur bei Bestrahlungen verdünnter wäßriger DNA-Lösungen beobachtet worden⁵⁹⁻⁶⁴. Die G-Werte für die Basenfreisetzung liegen dabei in der gleichen Größenordnung wie die G-Werte für analysierte Einzelstrangbrüche und alkalilabile Stellen (0,2 bis 0,4, wenn man die absorbierte Energie auf die bestrahlte Lösung bezieht⁵⁹⁻⁶⁴). Eine Übersicht über die einzelnen G-Werte, die bei der Bestrahlung von fester DNA in der vorliegenden Arbeit erhalten worden sind, gibt Tabelle 10.

Für die getrocknete Kalbsthymus-DNA, die im Hochvakuum bestrahlt wurde, betrug der G-Wert 0,2. DNA, die im Vakuum über P_2O_5 bei Raumtemperatur getrocknet worden ist, enthält in ihrer primären Hydrathülle noch gebundene Wassermoleküle (s. S. 27). Es handelt sich dabei um zwei fest gebundene Wassermoleküle, die die PO_2Na^+ -Gruppe des Phosphats hydrolysieren und vier Wassermoleküle an den P-O-C- bzw. C-O-C-Bindungen, insgesamt also 6 Wassermoleküle pro Nukleotideinheit³¹. Da dieses Wasser auch durch Trocknung nicht zu entfernen ist, wurde in der vorliegenden Arbeit die zu bestrahlende DNA

Tabelle 10: G-Wert für die Summe der abgespaltenen Basen aus γ -bestrahlter DNA bei 0°C, bezogen auf die Einwaage an trockener DNA. Dosisleistung: 9 Gy s⁻¹. (Angaben in Gewichtsprozent)

Bestrahlung im <u>Vakuum</u>	G(Basensumme)
DNA (trocken)	0,2
DNA / H ₂ O : 74% / 26%	ca. 0,2
DNA / H ₂ O : 33% / 67%	0,56
DNA / H ₂ O : 17% / 83%	0,8 - 0,9
DNA / H ₂ O / MeOH : 36% / 36% / 28%	0,12
DNA / MeOH : 20% / 80%	ca. 0,01
DNA / H ₂ O / t-BuOH : 36% / 36% / 28%	0,44
<u>Bestrahlung unter Sauerstoff</u>	
DNA (trocken)	0,6 - 0,7
DNA / H ₂ O : 33% / 67%	2,76
DNA / H ₂ O / MeOH : 36% / 36% / 28%	0,4
DNA / H ₂ O / t-BuOH : 36% / 36% / 28%	1,04

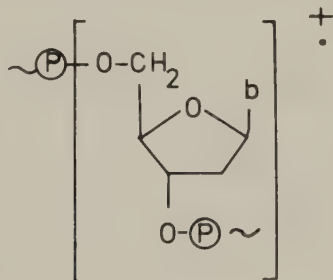
als "trocken" bezeichnet und entsprach damit dem Zustand der DNA, die andere Autoren als trocken bestrahlt bezeichnet haben. Der G-Wert von 0,2 wurde auch noch für DNA erhalten, die 26% Wasser enthielt. Bei einem Wassergehalt von 67% erhöhte sich der G-Wert um den

Faktor 2,8 und bei einem Wassergehalt von 83% um 4 bis 4,5, jeweils auf die absorbierte Energie in der trockenen DNA bezogen. In diesem DNA- H_2O - System kommt zu dem direkten Strahlungseffekt noch der indirekte Effekt durch das hinzugefügte Wasser, aus dem durch die Strahlung OH - Radikale, H - Atome und solvatisierte Elektronen erzeugt werden. Wie schon in der Einleitung ausgeführt, sind davon die OH - Radikale an der Ausbildung von Strangbrüchen beteiligt. Die bestrahlte DNA, die sich aus 33% DNA und 67% H_2O zusammensetzt, liefert einen G-Wert für die Basenabspaltung von 0,56, was bedeutet, daß der Anteil des direkten Effekts ($G = 0,2$) 36% ausmacht. Steigt der Wassergehalt an, 17% DNA : 83% H_2O , so erhält man einen G-Wert für die Basensumme von 0,8 bis 0,9, der Anteil des direkten Effekts beträgt dann nur noch 25 bis 22%. Dieser Befund, daß der G-Wert für den direkten Effekt ungefähr dem DNA- Anteil im bestrahlten System entspricht, gilt nicht für sehr hohe DNA- Konzentrationen - ab 74% DNA macht sich nur noch der direkte Effekt bemerkbar - ebenso auch nicht für sehr niedrige Konzentrationen - nach H. Geldermann⁸⁰ beträgt der G-Wert $G(\text{Basen}) \approx 1$ bei 1%- igen DNA- Gelen, bezogen auf DNA-Lösung, was auf DNA bezogen einem G-Wert von 100 entspricht und um Größenordnungen höher liegt.

Vergleicht man die Basenabspaltung für die einzelnen Basen (Tabelle 3 auf S. 36), so fällt auf, daß Adenin bevorzugt abgespalten wird.

Vergleicht man nun die Abspaltung der Basen bei der Bestrahlung trockener DNA im Vakuum mit der Bildung von Einzelstrangbrüchen ³³ (G(ssb) = 0,63 und ³⁴ G(ssb + ali) = 0,72), so sieht man, daß durch den direkten Strahlungseffekt die Basenfreisetzung mit einem G-Wert von 0,2 nur 30% des Anteils an Strangbrüchen ausmacht.

Durch die Bestrahlung von trockener DNA können durch direkte Ionisation Radikalkationen gebildet werden:



Für diese Radikalkationen besteht die Möglichkeit, Protonen zu eliminieren, insbesondere dann, wenn Wassermoleküle in unmittelbarer Nähe vorhanden sind. Dies ist aufgrund der primären Hydrathülle bei DNA der Fall (S.27). Nach einer Protoneneliminierung kann das C-4'- Radikal 12 entstehen, welches z.B. nach dem Mechanismus in Schema 2 (S.14) unter Bildung eines Strangbruches die Base freisetzen kann. Auch der in Schema 1 angeführte Mechanismus führt unter Basenabspaltung zum Strangbruch. Nach der Phosphatrestabspaltung des Radikals 12 und Wasseranlagerung entsteht Radikal 31. Für ein solches

Radikal besteht die Möglichkeit, mit einem benachbarten Radikal unter Ausbildung einer C-C- Bindung zu vernetzen. Solche Vernetzungen zwischen zwei reaktiven Zentren kommen besonders in Abwesenheit von Sauerstoff vor ³³. Tritt an dieser Stelle eine Vernetzung ein, ist der Strangbruch bereits fixiert, aber der Weg für eine Basenabspaltung blockiert. Auf diese Weise ist zu erklären, daß die Basenabspaltung nur einen Teil der Strangbruchrate ausmacht.

In Anwesenheit von Sauerstoff erhöht sich die Zahl der Einzelstrangbrüche nach Lücke-Huhle et al. ³⁴ um den Faktor 2. Schema 3 stellt einen Mechanismus dar, nach dem in Anwesenheit von Sauerstoff unter Basenabspaltung ein Strangbruch entsteht. Eine Erhöhung der Strangbruchrate hat daher auch eine Erhöhung der Basenabspaltung zur Folge. Tatsächlich sind für alle bestrahlten DNA- Systeme höhere G(Basen)-Werte bei Bestrahlung unter Sauerstoff gefunden worden (Tabelle 4, S.37).

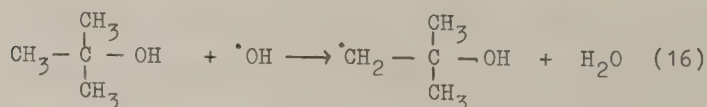
Der höchste G-Wert für die Baseneliminierung wurde für DNA, die 67% Wasser enthielt, unter Sauerstoff gemessen ($G = 2,76$). Dieser G-Wert blieb bis zu einer absorbierten Dosis von $3,3 \cdot 10^5$ Gy konstant und fiel bei höheren Dosen ab. Bei $3,3 \cdot 10^5$ Gy waren 3% der zur Bestrahlung eingesetzten DNA- Basen abgespalten. Oberhalb dieser Dosis besteht für ein γ -Quant die Möglichkeit, eine bereits abgespaltene Base zu zerstören, was sich in

einem Absorptionsverlust sowie durch Auftreten von Sekundärprodukten bemerkbar macht, infolgedessen sinkt der G-Wert (Abb. 5).

Wurde vor der Bestrahlung der DNA, die 67% Wasser enthielt, die Hälfte des Wasservolumens durch Methanol als Radikalfänger ersetzt, so sank der G-Wert für die Basenausbeute unter Vakuum auf 0,12 noch unter den Wert für getrocknete DNA ab. Methanol kann nach Gleichung (15) OH- Radikale abfangen:



Werden durch die Zugabe von Methanol alle Radikale abgefangen, so kann die Basenabspaltung nur noch über den direkten Effekt erfolgen. Für ein weiteres Absinken des G-Wertes unter 0,2 ist ein zusätzlicher Mechanismus verantwortlich. Methanol könnte z.B. in der Lage sein, primär gebildete DNA- Radikalkationen oder -Radikale abzufangen und damit vor einer nachfolgenden Basenabspaltung zu schützen. Anders sind die Verhältnisse beim tert. Butanol. Tert. Butanol kann nur als Radikalfänger für die gebildeten OH- Radikale fungieren und den G-Wert im Vergleich zur DNA ohne Radikalfänger nach Gleichung (16) herabsetzen:



Auch bei den mit Radikalfängern versetzten Proben war ein Sauerstoffeffekt bemerkbar. Im Methanol-System beträgt der G-Wert unter Sauerstoff 0,4 und fällt damit noch unter den G-Wert, der bei Bestrahlung von 67% Wasser enthaltender DNA im Vakuum erhalten wurde, was durch den zusätzlichen Schutzeffekt des Methanols zustandekommt. Bei tert. Butanol fällt der G-Wert unter Sauerstoff im Vergleich zu dem System DNA / H₂O : 33% / 67% (O₂) um den Faktor 2,6, liegt aber über dem G-Wert, der für DNA / H₂O : 33% / 67% (Vakuum) erhalten wurde.

4.2. Basenabspaltung bei γ -bestrahlten Zellkernen

Die Autoren Richmond und Zimbrick⁸¹ haben die Freisetzung von Thymin aus Prokaryonten, nämlich Escherichia coli bestimmt. In der vorliegenden Arbeit sind erstmals aus Zellkernen von Eukaryonten, den DNA-reichen Erythrozytenkernen aus Hühnerblut alle DNA-Basen nach γ -Bestrahlung analysiert worden. In dem abzentrifugierten "Zellkernpellet" sind eine Menge von Radikalfängern für die DNA enthalten. Den größten Anteil haben dabei die Proteine, die zwei Drittel des Gesamtrockengewichts des Zellkerns ausmachen. Die Basenausbeuten wurden auf die Summe der Nukleinsäuren bezogen, die ein Drittel des Trockengewichts der Zellkerne betragen, wobei 7,6% auf den Anteil der RNA entfallen. Das zu bestrahlende Pellet hatte mit dem ihm anhaftenden Wasser einen Wasser-

Tabelle 11: G-Wert für die Basensumme bei der Bestrahlung von Zellkernen bei 0°C mit einer Dosisleistung von 9 Gy s^{-1} . G-Wert, bezüglich trockener Nukleinsäureeinwaage.

Bestrahlung im <u>Vakuum</u>	G(Basensumme)
Zellkerne (Pellet)	0,44
Zellkerne (trocken)	0,2
Zellkerne, zerstört	0,7
Bestrahlung unter <u>Sauerstoff</u>	
Zellkerne (Pellet)	1,0
Zellkerne, zerstört	0,81

gehalt von 81,4%. Aus Tabelle 11 sind die erhaltenen G-Werte für die Basenabspaltung aus γ -bestrahlten Zellkernen ersichtlich. Der G-Wert für die Basenabspaltung betrug unter Vakuum 0,44 und wurde im Vergleich zu dem G-Wert der DNA, die 83% Wasser enthielt, um 50% herabgesetzt. Diese geringere Basenausbeute läßt sich darauf zurückführen, daß die DNA im Zellkern von schützenden Histonen und Nicht- Histon- Proteinen umgeben ist und die direkte Wirkung der γ -Strahlen überwiegt. Diesen hohen Beitrag der direkten Strahlenwirkung beobachten auch Bresler et al. ⁸² bei der Bestrahlung von Zellen. Wurden die Zellkerne vor der Bestrahlung getrocknet

und in diesem Zustand bestrahlt, so betrug der G-Wert für die Basenabspaltung 0,2 und stimmte so mit dem Wert für die getrocknete DNA unter Vakuum überein. In diesem trockenen System spielt die Anwesenheit von Radikalfängern keine Rolle, da keine OH- Radikale mit den Radikalfängern konkurrieren können. Es bleiben nur die durch den direkten Effekt der DNA hervorgerufenen Schäden wirksam. Wurde den durch Ultraschallbehandlung und Trocknung zerstörten Zellkernen die entzogene Wassermenge wieder zugefügt, so erhöhte sich der G-Wert unter Vakuum- Bestrahlung gegenüber dem als Pellet bestrahlten auf 0,7. Durch die Behandlung wurden die Zellmembranen zerstört und die Struktur des DNA- Protein- Komplexes weitgehend verändert und durch anschließendes Suspensieren in Wasser eine homogenere Verteilung der DNA bewirkt, der die gebildeten Radikale leichter zugänglich waren. Bei Bestrahlung des Pellets unter Sauerstoff ergab sich ein G-Wert von 1,0. In dieser Größenordnung liegt auch die Strangbruchrate für bestrahltes Chromatin in Lungenfibroblasten (Mee et al. ⁴³ $G(ssb + ali) = 1,25$, bezüglich DNA). Der OER-Wert für die Bestrahlung des Zellkernpellets beträgt 2,3. Andere Autoren ^{55,57,58} geben bei der Bestrahlung von Säugetierzellen für Strangbrüche OER- Werte von 3 bis 4 an.

4.3. Bildung veränderter Zucker bei der Bestrahlung von DNA

Bei der Bestrahlung von DNA unter Sauerstoff bei 0°C entstanden sowohl bei trockener als auch bei DNA mit einem Wassergehalt von 26% bzw. 67% folgende Produkte:

2-Desoxypentos-4-ulose 3, 6a bis 6c

2-Desoxytetrodialdose 7, 8

Erythrose-2,4-diphosphat 11

Diese Produkte wurden über ihre Trimethylsilylderivate durch GC-MS- Kopplung identifiziert. Die G-Werte für die Summe dieser Produkte bei der Bestrahlung unter Sauerstoff (0°C) betrugen: für

trockene DNA 0,16

DNA / H₂O : 74% / 26% 0,21

DNA / H₂O : 33% / 67% 0,36

Dabei entfallen auf 2-Desoxy-erythro-pentit 50% bis 40% des G-Wertes. Die Entstehung von Radikalkationen und Radikalen sowie die Bedeutung der Wassermoleküle, die die Hydrathülle der DNA - auch in trockener DNA - bilden, ist schon in 4.1. diskutiert worden. Unter Sauerstoff können C-2', C-4' und C-5'- Radikale gebildet werden, die dann zu den obenstehenden Produkten führen. Dabei kann 3 nach dem in Schema 1 angegebenen Mechanismus, 6a bis 6c nach Schema 2 entstehen, 7 bzw. 8 ohne Abspaltung des C-3'- Phosphatrestes nach Schema 3 und die alkalilabile Struktur 11 über das C-2'- Peroxylradikal und Spaltung der C-1'-C-2'- Bindung. Alle entstandenen

Produkte haben Basen abgespalten. Außer bei Produkt 11 sind Strangbrüche in der DNA- Kette entstanden. In allen bestrahlten Systemen liegt der G-Wert für die Basenfreisetzung höher als der G-Wert für die Bildung der obengenannten Produkte, die über Strangbrüche in der DNA entstanden sind, einschließlich der alkalilabilen Stellen. So beträgt bei der trocken bestrahlten DNA der G-Wert für die veränderten Zucker nur ca. 25% des G-Wertes für die Basenabspaltung und bei der 67% Wasser enthaltenden DNA nur 13% der Basenausbeute. Es werden also zusätzlich Basen abgespalten, ohne daß die genannten Produkte entstehen. Ob noch andere Zucker auf direktem Wege gebildet werden, die die Basen abgespalten haben und noch an der DNA hängen, bleibt eine offene Frage.

Ferner wurde der G-Wert für die Doppelstrangbrüche bei der γ -Bestrahlung von trockener DNA unter Sauerstoff bei 0°C durch die Lichtstreuemethode ermittelt. Der G-Wert betrug 0,09. In der Literatur werden für die Bestrahlung unter Stickstoff Werte von 0,06 bis 0,13 für Doppelstrangbrüche angegeben ⁴ und unter Sauerstoff G-Werte, die um ungefähr den Faktor 2 größer sind (0,16 bei Hagen und Wellstein ³³). Es bestehen wenig Übereinstimmungen unter den Autoren. Die Messungen beruhen auf Sedimentationsanalysen. Der hier gemessene Wert von 0,09 liegt unterhalb dieses Bereiches. Dazu sei bemerkt, daß in geringem Maße auch unter Sauerstoff

intra- und intermolekulare Vernetzungen in der DNA auftreten können. Werden in zwei DNA- Bruchstücken aktive Radikalstellen in unmittelbarer Nähe erzeugt, so können sie sich aneinanderlagern und ein größeres Bruchstück bilden. Da die Streulichtmethode ein mittleres Molekulargewicht liefert, bilden siese vernetzten Stellen ein größeres Molekulargewicht und führen damit zu einer geringeren Strangbruchrate.

4.4. Reaktion der Bestrahlungsprodukte mit 2-Thiobarbitursäure

In der vorliegenden Arbeit wurden strahleninduzierte Veränderungen an der 2-Desoxyriboseeinheit der DNA durch die Reaktion mit 2-Thiobarbitursäure in den DNA-Modellen, bei denen der direkte Strahlungseffekt überwog, untersucht. Es konnte ein Chromophor mit 2-TBA nachgewiesen werden, der wie der Malondialdehyd-TBA-Chromophor bei 532 nm ein Absorptionsmaximum besaß. Malonaldehydähnliche chromophorbildende Substanzen wurden bisher nur in wäßrigen verdünnten Lösungen und in Anwesenheit von Sauerstoff beschrieben ^{77,44,60}. Hier konnte jedoch auch bei Bestrahlung im Vakuum ein Chromophor nachgewiesen werden.

Die Bestrahlung wurde sowohl im Vakuum als auch unter Sauerstoff bei 0°C mit einer Dosisleistung von 9 Gy s^{-1}

durchgeführt. Die erhaltenen G-Werte für die Bestrahlungen der getrockneten DNA, der DNA mit einem Wassergehalt von 67% und der mit den Radikalfängern Methanol und tert. Butanol versetzten DNA sind in Tabelle 12 angegeben.

Durch die gleichzeitige Anwesenheit von Wasser und Sauerstoff stieg der G-Wert auf das 7-fache gegenüber dem G-Wert von trockener DNA unter Vakuum.

Es war zu klären, ob bei der γ -Bestrahlung von DNA durch den direkten Effekt freier Malondialdehyd entstand und den Chromophor mit TBA bildete - wie bei der Bestrahlung wäßriger DNA-Lösungen von Krushinskaya und Shal'nov ⁷⁷ angenommen wurde - oder die Komponenten an die DNA gebunden und durch saure Hydrolysebedingungen und die Anwesenheit von TBA Malondialdehyd freigesetzt würde - wie Kapp und Smith ⁴⁴ beschrieben, deren Meinung sich auch Ullrich und Hagen ⁶⁰ anschlossen - oder ob freie "Basenpropenale" ⁷⁸ gebildet würden, wie bei der Behandlung von DNA mit Bleomycin.

Zur Charakterisierung des unter Sauerstoff gebildeten Chromophors wurde u.a. eine Dünnschichtchromatographie durchgeführt. Diese ergab, daß weder Malondialdehyd noch Basenpropenale freigesetzt wurden. Dagegen ließ die Chromophorbildung am Start der DC-Platte, wo sich die Nukleotide befanden, darauf schließen, daß der

Tabelle 12: G-Wert für die Bildung des Chromophors mit 2-Thiobarbitursäure aus γ -bestrahlter DNA bei 0°C, bezogen auf die Einwaage an trockener DNA. Dosisleistung: 9 Gy s⁻¹. (Angaben in Gewichtsprozent)

* Initiale G-Werte, auf Dosis 0 extrapoliert

Bestrahlung im <u>Vakuum</u>	G(Chromophor)
DNA (trocken)	0,1
DNA / H ₂ O : 33% / 67%	0,15
DNA / H ₂ O / MeOH : 36% / 36% / 28%	0,065
DNA / H ₂ O / t-BuOH : 36% / 36% / 28%	0,15
Bestrahlung unter <u>Sauerstoff</u>	
DNA (trocken)	0,14 - 0,17*
DNA / H ₂ O : 33% / 67%	0,70*
DNA / H ₂ O / MeOH : 36% / 36% / 28%	0,11
DNA / H ₂ O / t-BuOH : 36% / 36% / 28%	0,34*

Chromophor aus Substanzen, die noch an der DNA- Kette hingen, gebildet wurde. Diesen Befund bestätigte auch eine Gelchromatographie an Sephadex G 10, wobei 82% des Chromophors in der Nukleotidfraktion nachgewiesen werden konnten. Außerdem wurden durch Ausfällen der bestrahlten und aufgelösten DNA mit Ethanol 80% des Chromophors im

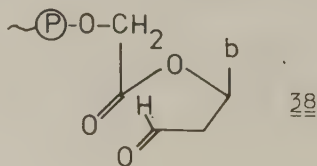
Sediment der makromolekularen DNA- Stücke gefunden. Malondialdehyd ist in sauren und neutralen, konzentrierten Lösungen nicht beständig. Die Chromophorbildung blieb aber auch nach dem Einengen bis zur Trocknen erhalten. Selbst bei Proben, die bei pH 2,7 zehn Minuten inkubiert wurden, ließen sich nach dem Einengen noch 72% des Chromophors nach Ausfällen mit Ethanol im Überstand und Sediment zusammen nachweisen. Wurde das ausgefällte Sediment 15 Minuten bei pH 2,2 auf 100°C erhitzt (entsprechend den Reaktionsbedingungen zur Herstellung des TBA- Chromophors), so befanden sich im Hydrolysat - nach der Reaktion mit TBA - 93% der chromophorbildenden Substanz. Durch erneutes Ausfällen dieses Hydrolysats und Einengen des Überstands konnte gezeigt werden, daß 19% Malondialdehyd freigesetzt worden waren. Die sauren Reaktionsbedingungen und Erhitzen auf 100°C reichten also nur aus, um 19% des Chromophors aus der DNA vor der Reaktion mit TBA freizusetzen.

Die in 3.4.6. aufgestellte Kinetik zeigt, daß Malondialdehyd, der durch saure Hydrolyse aus Malondialdehydbis(dimethylacetal) hergestellt worden ist, den Chromophor mit einer Halbwertszeit von $t_{1/2} = 2$ min schneller bildet als γ -bestrahlte DNA. Bei DNA / H₂O : 33% / 67% (O₂) wurden 50% des Chromophors in 3,4 Minuten gebildet. Diese Ergebnisse stimmen im Fall des Malondialdehyds mit denen von Burger et al.⁷⁹ überein, die bei der

geringeren Temperatur von 86°C $t_{1/2} = 2,2$ Minuten angeben, widersprechen aber deren Resultaten für Bleomycin behandelte DNA, wonach die Chromophorbildung schon nach ca. 2 Minuten abgeschlossen sei. Ein weiterer Beweis, daß nach den Reaktionsbedingungen nicht vollständig freier Malondialdehyd gebildet wird, ist der Befund, daß sauer hydrolysierte DNA den Chromophor nicht wesentlich schneller bildet (3,2 min für 50% des Chromophors). Auch Téoule et al.⁶⁴ konnten bei der Bestrahlung von Thymidin-5-phosphat keinen Malondialdehyd nachweisen.

Nach Abb. 16 (S.71) fällt bei Anwesenheit von Sauerstoff der G-Wert für die Bildung des TBA- Chromophors mit zunehmender Dosis ab. Dieser Effekt wird auch noch bei niedrigeren Dosisleistungen beobachtet. Daher kann eine dosisleistungsabhängige Kettenreaktion ausgeschlossen werden.

Man kann für das System DNA / H_2O / O_2 , in dem die Entstehung von Produkten, die an die DNA gebunden sind und nach saurer Hydrolyse freien Malondialdehyd bilden (20% des Gesamtchromophors), folgende hydrolyseempfindliche Struktur annehmen:



In 38 ist die C-3'-C-4'- Bindung der 2-Desoxyribose-einheit gespalten. Diese Verbindung 38 wird durch saure Hydrolyse und Erhitzen aufgespalten und liefert unter Basenabspaltung Malondialdehyd.

Die Struktur der restlichen 80% der chromophorbildenden Substanz, die nicht aus 38 stammt, ist noch nicht geklärt. Es ist anzunehmen, daß es sich dabei nicht um eine einheitliche Verbindung handelt. So ist es denkbar, daß die stark sauren Hydrolysebedingungen zu konjugierten ungesättigten Verbindungen führen, die dann mit Thiobarbitursäure einen Chromophor bilden, dessen Absorptionsbereich den bei 532 nm beeinflußt.

V EXPERIMENTELLER TEIL

5.1. Substanzen

5.1.1. Käufliche Substanzen

Folgende Substanzen waren im Handel erhältlich und wurden ohne weitere Reinigung eingesetzt:

Desoxyribonukleinsäure (DNA) aus Kälberthymus, reinst, Serva; Proteingehalt nach Lowry et al. $10^1 < 0,5\%$;
Thymin, puriss., Fluka; Cytosin, biochemisch rein, Merck;
Adenin, p.A., Serva; Guanin, biochemisch rein, Waldhof;
D(-)-Sorbit, reinst, Merck; L(+)-Rhamnose- Monohydrat,
D(-)-Ribose, Ribose-5-phosphat-Monobariumsalz, 2-Desoxy-
D-Ribose, alle biochemisch rein, Merck;
Methanol, Ethanol, tert. Butanol, p.A., Merck;
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris) p.A., Merck;
Natriumbordeuterid, Deuterierungsgrad mind. 98%, Merck;
2-Thiobarbitursäure, Malondialdehydbis(dimethylacetal),
p.A., Merck;
N,N-bis-Trimethylsilyl-trifluoracetamid (BSTFA), Macherey,
Nagel u. Co.; Trimethylchlorsilan (TMCS), p.A., Merck;

An Enzymen wurden verwendet:

alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (E.C. 3.1.3.1.),
Boehringer;

Proteinase K, aus Tritirachium album, Boehringer

5.1.2. Reinigung der Verbindungen

Triethylamin, p.A., Merck, wurde durch dreistündiges Kochen am Rückfluß mit Amidol (2,4-Diaminophenoldihydrochlorid), p.A., Merck und anschließender Destillation gereinigt⁸³. Eine 2 M Triethylammoniumacetat- Stammlösung (TEAA) wurde durch Zutropfen von destilliertem Triethylamin zu einer wäßrigen Essigsäurelösung bereit.

5.1.3. Zellkerne

Die Zellkerne wurden aus Erythrozyten von Hühnerblut, wie in meiner Diplomarbeit⁸⁴ beschrieben, isoliert. Die erhaltene Zellkernsuspension wurde in lytischer Lösung bei -18°C aufbewahrt. 1 ml der Zellkernsuspension enthielt 11,31 mg Nukleinsäuren.

Zusammensetzung der lytischen Lösung:

Nonidet P 40, Ethylphenylpolyethylenglykol, Fluka 0,25%
Saccharose, 0,25 M
CaCl₂ 3,3 mM

Nach dem Auftauen wurden Reste von noch anhaftendem Hämoglobin durch dreimaliges Waschen mit 0,9%- iger NaCl- Lösung entfernt.

5.1.3.1. Isolierung von Zellkernen ⁸⁴

Zentrifuge: Beckman Kühlzentrifuge J21, mit Festwinkel-
rotor JA 10

Phosphatpuffer (pH 7,4): 0,14 M NaCl
2,7 mM KCl
0,01 M Na₂HPO₄
1,5 mM KH₂PO₄

2 l Hühnerblut wurden unter Eiskühlung in 200 ml 10%-
iger Natriumcitratlösung aufgefangen. Es wurde 30 min
bei 2000 rpm (400xg) bei 4 C zentrifugiert und das über-
stehende Serum dekantiert, mit Phosphatpuffer homogeni-
siert und durch Glaswolle filtriert, um von koagulierten
Bestandteilen und Verunreinigungen abzufiltrieren.
Danach wurde noch zweimal wie oben homogenisiert und
zentrifugiert.

Zur Lysis der Blutzellen wurden insgesamt 6,4 l der
lytischen Lösung (5.1.3.) verwendet. Die Zellen wurden
mit 1,2 l der lytischen Lösung homogenisiert und mit
1500 rpm zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde noch fünf-
mal wiederholt, beim letzten Mal mit 240 ml lytischer
Lösung.

Die Zellkerne wurden im H mocyotometer gezählt:

$3 \cdot 10^9$ Kerne / ml.

5.2. Strahlenquelle und Dosimetrie

Als Strahlenquelle wurde eine Co-60- γ -Quelle von 7000 Curie (Nuclear Engineering Ltd., "Irradiation Unit Type LCU 2") verwendet. Die Probengefäße wurden in ein mit Kühlmantel versehenes Doppelwandgefäß gestellt und bei 0°C im Innenfeld der Quelle bestrahlt.

Die Dosisleistung wurde mit dem Fricke-Dosimeter bestimmt⁸⁵⁻⁸⁸. Zur Fricke-Dosimetrie wurde eine Lösung, die $2 \cdot 10^{-3}$ M Eisen-II-sulfat, $2 \cdot 10^{-3}$ M Natriumchlorid und 0,4 M Schwefelsäure enthielt, mit Sauerstoff gesättigt und im Tubus der Co-60- γ -Quelle bestrahlt.

Anschließend wurde die Absorption der Lösung bei 305 nm gegen die unbestrahlte Lösung spektrophotometrisch im Lambda 5 UV/VIS Spektrophotometer (Perkin Elmer) gemessen. Der Extinktionskoeffizient der Eisen-III-Ionen beträgt bei 18°C 2090, bei 28°C 2244 l mol⁻¹ cm⁻¹ und wird für die Zwischenwerte interpoliert. Der G-Wert für die Eisen-III-Ionen beträgt 15,6. Die Dosisleistung betrug am Anfang der Arbeit 9,0 Gy s⁻¹ und am Ende 8,5 Gy s⁻¹, entsprechend $2,016 \cdot 10^{20}$ bis $1,9 \cdot 10^{20}$ eV g⁻¹ h⁻¹.

5.2.1. Bestrahlung der DNA

Als Bestrahlungsgefäße dienten Pyrexglasgefäße (Durchmesser 14 mm) mit einem Begasungsaufsatz. Jeweils 40 mg DNA wurden im Vakuumexsikkator 18 Stunden über P_2O_5 bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. In anderen Versuchen wurde die auf diese Weise getrocknete DNA mit Wasser bzw. einem 44%-igen wäßrigen Methanol- oder tert. Butanolgemisch zwei Stunden lang equilibriert.

Folgende Angaben sind in Gewichtsprozent:

DNA / H_2O : 33% / 67%

DNA / H_2O / MeOH : 36% / 36% / 28%

DNA / H_2O / t-BuOH: 36% / 36% / 28%

Die Proben wurden anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren, auf 10^{-4} Torr mit einer Öldiffusionspumpe evakuiert und im Falle der unter Vakuum bestrahlten DNA in Ampullen eingeschmolzen. Bei feuchter bestrahlter DNA oder DNA mit Alkoholzusatz wurde nach dem Evakuieren das Gasvolumen (20 ml) mit Sauerstoff aufgefüllt. Das Evakuieren und Auffüllen des Gasvolumens mit Sauerstoff wurde noch zweimal wiederholt. An den Gefäßwänden einkondensierter Sauerstoff konnte nach allmählichem Aufwärmen auf $0^\circ C$ gasförmig in einen Ballon entweichen. Die so mit Sauerstoff gesättigte Probe wurde verschlossen, mit einem Kühlmantel versehen und bei $0^\circ C$ mit einer Dosisleistung von 9 Gy s^{-1} im Tubus der Co-60- γ -Quelle bestrahlt. Die Dosen betrugen $3 \cdot 10^4$ bis $2 \cdot 10^6 \text{ Gy}$, was einer Bestrahlungszeit von 1 bis 70 Stunden entsprach.

5.2.2. Bestrahlung der Zellkerne

3 ml der Zellkernsuspension wurden aufgetaut und in Eppendorfspitzen in einer Sorvall SS 3 Zentrifuge mit Rotor SS 34 bei 4000 rpm zehn Minuten zentrifugiert. Das Sediment wurde mit Puffer A homogenisiert und erneut bei 4000 rpm zentrifugiert. Dieser Waschvorgang wurde noch einmal wiederholt. Zur Überführung des Sediments in das enge Bestrahlungsgefäß wurde das Pellet in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Probe wurde anschließend auf 10^{-4} Torr evakuiert und eingeschmolzen, oder für andere Proben nach dem Evakuieren das Gasvolumen des Gefäßes mit Sauerstoff aufgefüllt. Das Evakuieren und Auffüllen des Gasvolumens mit Sauerstoff wurde noch zweimal wiederholt. An den Wänden einkondensierter Sauerstoff konnte nach allmählichem Aufwärmen auf 0°C gasförmig in einen Ballon entweichen. Die so mit Sauerstoff gesättigten Proben wurden verschlossen und wie unter 5.2.1. beschrieben, bestrahlt.

Puffer A: 0,05 M Tris-HCl, pH 7,5

0,01 M NaCl

Zur Bestimmung des Wassergehalts des zu bestrahlenden Pellets wurden durch Zugabe von Wasser und anschließender zweiminütiger Ultraschallbehandlung die Kernmembranen zerstört und das Wasser am Rotationsverdampfer abdestilliert. Nach dem Trocknen im Vakuumexsikkator über

P₂O₅ bis zur Gewichtskonstanz konnte das Trockengewicht festgestellt werden. Es entsprach dem Trockengewicht der Probe, der durch Gefriertrocknung das Wasser entzogen wurde.

In einem anderen Versuch wurden den lysierten, mit Ultraschall behandelten und durch Gefriertrocknung zerstörten Zellkernen die entsprechende Menge an Wasser wieder zugefügt und sie dann wie unter 5.2.1. bestrahlt.

5.3. Lysis der bestrahlten Zellkerne

Das bestrahlte Pellet wurde in 5 ml 0,02 M Tris-HCl-Puffer, pH 7,6 im Ultraschallbad (Sonorex RX 106, Bandelin) 5 Minuten beschallt. Nach Zugabe von 45 ml H₂O und 2,5 mg Proteinase K (50 µg ml⁻¹)^{89,90} wurde die Suspension 15 Stunden bei 37°C inkubiert. Die klare, gelbgefärbte Lösung wurde eingeeengt und zur Säulenchromatographie eingesetzt.

5.4. Analytik zur Baseneliminierung

5.4.1. Säulenchromatographie an DEAE- Sephadex A 25

Die bestrahlte und in Wasser aufgelöste DNA bzw. die lysierten Zellkerne wurden auf die Sephadex- Anionen-

austauschersäule zur Abtrennung der Nukleobasen von Nukleotiden, Oligonukleotiden und DNA aufgetragen. Die Elution mit 0,02 M Tris-HCl- Puffer pH 7,6 wurde mit einem Knauer- Festwellendetektor bei 254 nm verfolgt. Nach der Elution der Basen wurde mit einem Gradienten von 0,02 M Tris-HCl, pH 7,6 auf 2 M NaCl durch Erhöhung der Kochsalzkonzentration die Nukleotidfraktion heruntergewaschen. Die Basenfraktion wurde am Rotationsverdampfer eingeengt.

Säule : 250 x 25 mm
stationäre Phase : DEAE- Sephadex A 25, Pharmacia Fine
Chemicals, Uppsala, Schweden
Elutionsmittel : 0,02 M Tris-HCl, pH 7,6
Durchfluß-
geschwindigkeit : 60 ml h⁻¹

5.4.2. Hochdruckflüssigkeitschromatographie

Die auf 5 ml eingeengten Basenfraktionen von der Säulenchromatographie wurden in einem Hochdruckflüssigkeitschromatographen der Firma Hewlett Packard des Typs 1010 B aufgetrennt. Als Elutionsmittel diente entgaster Triethylammoniumacetatpuffer, pH 4,6, der nach 5.1.2. hergestellt wurde. Die Elution der Basen wurde mit einem UV - Detektor (Schoeffel SF 770) bei einer Wellenlänge von 260 nm verfolgt. Zur Eichung dienten die

Flächenwerte, die unter den gleichen Bedingungen mit authentischem Material erhalten wurden. Der Konzentrationsbereich der zur quantitativen Bestimmung eingesetzten Probelösungen betrug $4 \cdot 10^{-6}$ bis $2 \cdot 10^{-4}$ M.

stationäre Phase : Nucleosil 5 SA, 150 x 4,6 mm, Macherey,
Nagel u. Co., im Hause gefüllt

Probenschleife : 50 μ l

Durchfluß-

geschwindigkeit : 0,4 ml min⁻¹

Druck : ca. 40 bar

Detektor : UV- Detektor SF 770, Schoeffel

Elutionsmittel : 0,055 M TEAA, pH 4,6

5.5. Analyse der veränderten Zucker und Zucker- endgruppen

5.5.1. Reduktion

Die bestrahlte DNA wurde nach dem Auflösen in Wasser (2-4h) mit einem Überschuß an Natriumborodeuterid versetzt und 18 Stunden bei Raumtemperatur reduziert. Der pH-Wert stieg auf ca.9 an. Als innerer Standard diente Ribose-5-phosphat. Das überschüssige Reduktionsmittel wurde durch Ansäuern mit 1 M Ameisensäure in Borsäure überführt

und diese nach der Zugabe von Methanol als leicht flüchtiger Borsäuremethylester am Rotationsverdampfer entfernt. Dieser Abdampfvorgang mit Methanol wurde noch fünfmal wiederholt.

5.5.2. Alkalische Hydrolyse

Die Hydrolyse der DNA-Lösung wurde mit 0,3 M Kaliumhydroxidlösung bei pH 12,5 während 20 Stunden bei 37°C durchgeführt.

5.5.3. Inkubation mit alkalischer Phosphatase

Die alkalische Lösung wurde mit einer pH-Glas-Elektrode von Radiometer, Kopenhagen, mit 1 M Ameisensäure auf pH 8,0 eingestellt. Die Lösung wurde anschließend 16 Stunden bei 37°C mit alkalischer Phosphatase ($0,4 \text{ U ml}^{-1}$) inkubiert. Zu der Lösung wurden 10^{-2} M Magnesiumchlorid und 10^{-4} M Zinkchlorid zur Aktivierung des Enzyms hinzugefügt.

5.5.4. Gaschromatographie

Vor der gaschromatographischen Analyse wurden die höhermolekularen Bestandteile durch eine Ultrafiltration in der Ultrafiltrationsapparatur TCF 10, Amicon, mit dem Filter UM 10 (für Molekulargewichte $> 10\,000$) bei 3,5 bar

abgetrennt.

Das Filtrat wurde mit dem Mischbettionenaustauscher Amberlite MB 2, Serva, in verdünnter Lösung entsalzt. Es mußte mit 600 ml Wasser nachgewaschen werden, um Verluste durch Adsorption von Polyalkoholen zu vermeiden.

Die so erhaltenen Bestrahlungsprodukte wurden gefriergetrocknet und silyliert ⁹¹. Hierzu wurde der trockene Rückstand in 600 µl über KOH getrocknetem Pyridin aufgenommen und mit 600 µl BSTFA und 60 µl TMCS unter Rühren bei Raumtemperatur 24 Stunden silyliert. Es wurde ein Gaschromatograph des Typs Varian 3700 mit Flammenionisationsdetektor verwendet. Die Proben wurden auf verschiedenen Glaskapillarsäulen, die im Max-Planck-Institut für Kohlenforschung hergestellt worden waren, analysiert ^{92,93}.

OV-101	: 40 m, 0,25 mm i.D.
SF 96	: 33 m, 0,25 mm i.D.
SE 30	: 50 m, 0,25 mm i.D.

Temperaturprogramm : 60 - 260°C

Trägergas : Wasserstoff

Zur GC-MS- Kopplung mußte überschüssiges Silylierungsmittel im Vakuumexsikkator über P_2O_5 entfernt werden.

Die GC-MS- Kopplung wurde im Institut für Kohlenforschung durchgeführt.

5.6. Streulichtmessung

Die Streulichtmessungen wurden nach der Bedienungsanleitung des Kleinwinkel- Laser- Lichtstreuophotometers des Typs KMX - 6 der Firma Chromatix durchgeführt.

Die bestrahlte DNA wurde in 0,5 M KCl- Lösung pH 7,4 über Nacht bei 4°C aufgelöst ⁹⁴ und die Konzentrationen photometrisch bestimmt ⁹⁵. Von dieser Stammlösung (ca. 110 $\mu\text{g ml}^{-1}$) wurden Verdünnungsreihen von 1 - 100 $\mu\text{g DNA ml}^{-1}$ hergestellt. Es wurden Filter von Millipore Typ HA mit einem Durchmesser von 0,45 μ verwendet. Von den verschieden konzentrierten DNA- Lösungen wurden die R_{θ} - Werte bestimmt. R_{θ} für 0,5 M KCl betrug $1,48 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^{-1}$.

5.7. Reaktion mit 2-Thiobarbitursäure

Die γ -bestrahlte DNA wurde in Wasser aufgelöst. Der Strahlenschaden an der 2-Desoxyriboseeinheit der DNA, wurde über den Thiobarbitursäurechromophor bei einer Wellenlänge von 532 nm spektrophotometrisch im Lambda 5 UV/VIS Spectrophotometer (Perkin Elmer) bestimmt. Zur Durchführung des Versuchs wurden 1 ml der bestrahlten Probelösung mit 2 ml Reagenzlösung versetzt und 15 Minuten auf 100°C erhitzt. Nach dem Abkühlen auf

Zimmertemperatur wurde die Absorption bei 532 nm gegen die Blindlösung gemessen.

Zur Herstellung der Eichlösung⁹⁶ wurden 7,5 µl Malondialdehydbis(dimethylacetal) mit 1 ml konz. HCl versetzt, drei Minuten auf 50°C erhitzt und mit Wasser auf 500 ml verdünnt. (6,54 µg Malondialdehyd / ml). Der Extinktionskoeffizient betrug $1,46 \cdot 10^5 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, in der Literatur⁹⁷ $1,51 \cdot 10^5 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Zur Herstellung der Reagenzlösung wurden 0,6 g 2-Thio-barbitursäure unter gelindem Erwärmen in 12 ml 0,1 M NaOH gelöst und mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt. Der pH-Wert der Lösung betrug 2.

5.7.1. Säulenchromatographie an Sephadex G 10

Die bestrahlten DNA-Proben wurden in Wasser aufgelöst, zur Gelchromatographie auf die Sephadex G 10- Säule aufgetragen und mit Wasser eluiert. Die Absorption wurde bei 254 nm mit einem Knauer Festwelledetektor verfolgt.

Säule : 200 x 25 mm

stationäre Phase : Sephadex G 10, Pharmacia Fine Chemicals,
Uppsala, Schweden

Durchfluß-

geschwindigkeit : 60 ml h^{-1}

5.7.2. Dünnschichtchromatographie

Platte : Kieselgel 60 G F₂₅₄ (Merck)
Fließmittel (1) : Chloroform / Methanol / Wasser:
60 / 50 / 30
hiervon wird die untere Phase mit
5% Methanolzusatz verwendet.
Fließmittel (2) : Ethylacetat / Isopropanol / Wasser:
74 / 17 / 9
Sprühmittel : 0,6% 2-Thiobarbitursäurelösung in
Wasser; 15 Minuten bei 100°C
entwickeln.

(Angaben in Volumenprozent)

5.7.3. Fällungen mit Ethanol

2,5 ml der DNA-Lösungen (ca. 20 ml DNA) wurden mit 0,05 ml 1 M MgCl₂-Lösung und 0,375 ml 4 M NaCl-Lösung versetzt und auf 5 ml verdünnt. Hierzu wurde das 2,5-fache Volumen an 96%-igem Ethanol hinzugefügt, umgeschüttelt und bei -68°C 20 Minuten ausgefroren⁹⁸. Durch anschließende Zentrifugation in einer Sorvall Zentrifuge (SS34, 10 Minuten, 10 000 rpm) konnte das Sediment vom Überstand getrennt werden.

VI ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit sind niedermolekulare Produkte, die aus der γ -Bestrahlung von DNA in festem Zustand resultieren, isoliert und quantitativ bestimmt worden. Die Arbeit besteht aus drei Teilen.

Im ersten Teil handelt es sich um die Freisetzung von unveränderten Nukleobasen. Die Bestrahlung erfolgte sowohl im Vakuum als auch unter Sauerstoff. Der G-Wert betrug im Falle der trocken bestrahlten DNA im Vakuum 0,2. Bei einem Wassergehalt von 67% (System DNA / H_2O : 33% / 67%) stieg die Basenausbeute auf $G = 0,56$. Der Einfluß der Radikalfänger Methanol und tert. Butanol wurde ebenfalls untersucht. Wurde die Hälfte des Wasservolumens durch Methanol ersetzt, so fiel der G-Wert auf 0,12, bei DNA / MeOH auf ca. 0,01 und bei tert. Butanol entsprechend auf 0,44. Außerdem konnte für alle bestrahlten Systeme ein deutlicher Sauerstoffeffekt, nämlich OER- Werte zwischen 2,4 und 4,6 festgestellt werden. Die Basenausbeuten wurden mit den aus der Literatur bekannten G-Werten für Strangbrüche verglichen und Mechanismen diskutiert, die zur Abspaltung von Basen führen können. Im Falle der trocken bestrahlten DNA macht die Basenfreisetzung ca. 30% des Anteils an Strangbrüchen aus.

Die Freisetzung von DNA- Basen wurde erstmals auch an Zellkernen eukariotischer Zellen, den Erythrozytenkernen des Hühnerblutes, untersucht. Bei der Bestrahlung von Zellkernen als Pellet betrug der G-Wert unter Vakuum 0,44, der unter Sauerstoff 1,0. Daraus ergab sich ein OER- Wert von 2,3. Es überwog - wie bei der Bestrahlung der festen DNA - der direkte Strahleneffekt.

Der zweite Teil der Arbeit behandelt die Isolierung und Identifizierung von strahleninduzierten Veränderungen an der 2-Desoxyriboseeinheit der DNA. Auch hier konnten erstmals für die Bestrahlung von trockener DNA unter Sauerstoff Zucker und Zuckerendgruppen sowie alkalilabile Stellen nachgewiesen werden, die bisher nur bei der Bestrahlung wäßriger DNA- Lösungen gefunden wurden. Neben einigen weniger charakteristischen Produkten entstanden 2-Desoxypentos-4-ulose (3, 6a bis 6c), 2-Desoxytetrodialdose (7, 8) und Erythrose-2,4-diphosphat (11), die derivatisiert und gaschromatographisch analysiert wurden. Die eindeutige Identifizierung lieferte eine Gaschromatographie- Massenspektrometrie-Kopplung. Die Summe der G-Werte dieser Produkte betrug bei trocken bestrahlter DNA 0,16, bei DNA, die 67% Wasser enthielt 0,36, wobei auf den Anteil des 2-Desoxy-erythro-pentits 50% bzw. 40% entfielen. Es wurden Mechanismen diskutiert, bei denen diese Produkte mit Ausnahme der alkalilabilen Stelle (11) Strangbrüche und gleichzeitige Basenabspaltung in der DNA verursachten. Mit

Hilfe der Streulichtmessung konnte für die Bildung von Doppelstrangbrüchen ein G-Wert von 0,09 ermittelt werden.

Im dritten Teil wurde untersucht, ob bei der γ -Bestrahlung von DNA Malondialdehyd entstünde. Es konnte gezeigt werden, daß weder freier Malonaldehyd noch Basenpropenale entstanden, sondern Produkte, die noch an die DNA gebunden waren und einen Chromophor mit 2-Thiobarbitursäure bildeten. Bei DNA / H₂O : 33% / 67% betrug der G-Wert 0,7. Die anderen G-Werte sind aus Tabelle 9 S.74 zu entnehmen. Für einen Teil des Gesamtchromophors (20%) ist eine hydrolyseempfindliche Struktur vorgeschlagen worden, die nach sauren Reaktionsbedingungen Malonaldehyd freisetzt. Die Struktur der restlichen chromophorbildenden Substanz ist noch nicht geklärt worden.

In der vorliegenden Arbeit ist der direkte Strahlungseffekt sowohl an DNA- Systemen als auch an Erythrozytenzellkernen untersucht worden. Durch die Isolierung von niedermolekularen Bestrahlungsprodukten stellt diese Arbeit einen Beitrag zum Verständnis der Strahlenchemie in einer eukariotischen Zelle dar, in der dem direkten Effekt auf die DNA und den daraus resultierenden Strahlenschäden eine entscheidende Rolle für die genetische Information zugeschrieben wird.

VII ANHANG

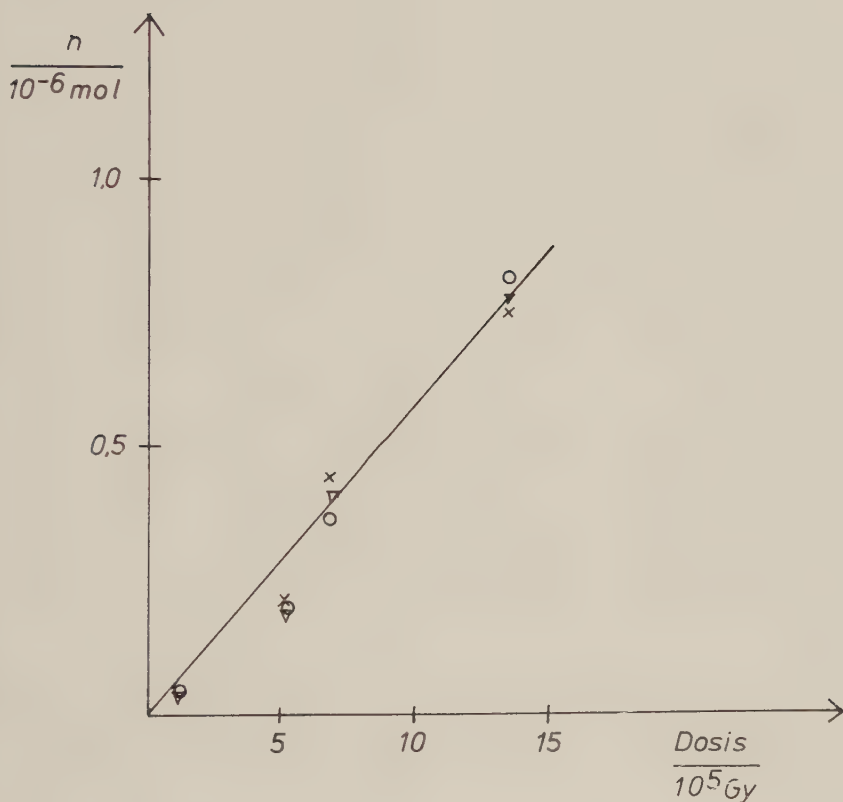


Abb. A 1: Dosisabhängigkeit der Basenabspaltung bei der Bestrahlung von trockener DNA bei 0°C im Vakuum, bezogen auf 100 mg trockene DNA. Dosisleistung: 9 Gy s^{-1} .

× Thymin
 ∇ Cytosin
 ○ Adenin

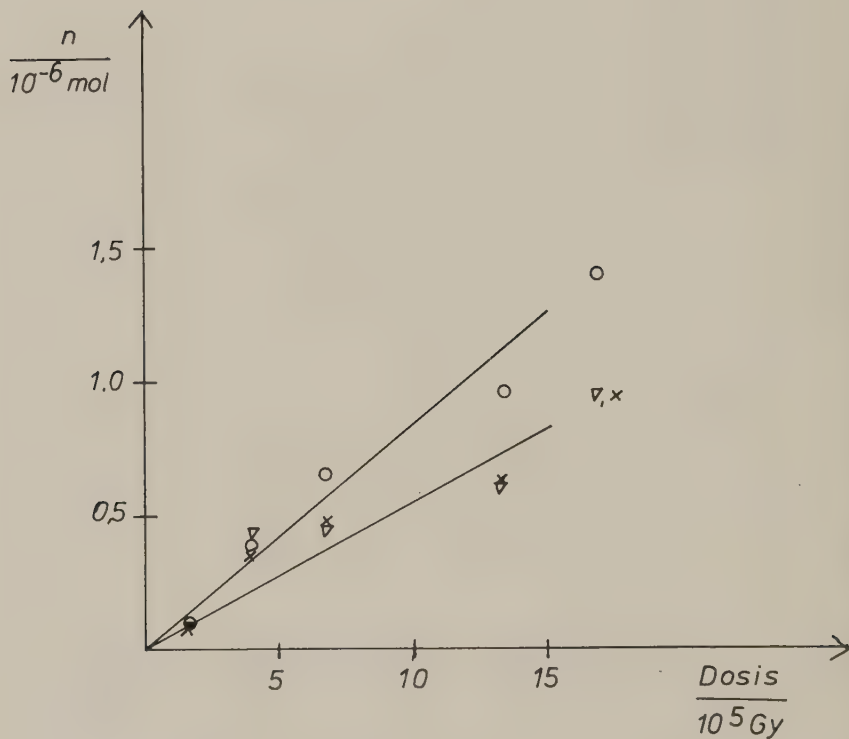


Abb. A 2: Dosisabhängigkeit der Basenabspaltung bei der Bestrahlung von DNA / H_2O : 74% / 26% bei 0°C im Vakuum, bezogen auf 100 mg trockene DNA.

Dosisleistung : 9 Gy s^{-1} .

x Thymin

∇ Cytosin

○ Adenin

(Angaben in Gewichtsprozent)

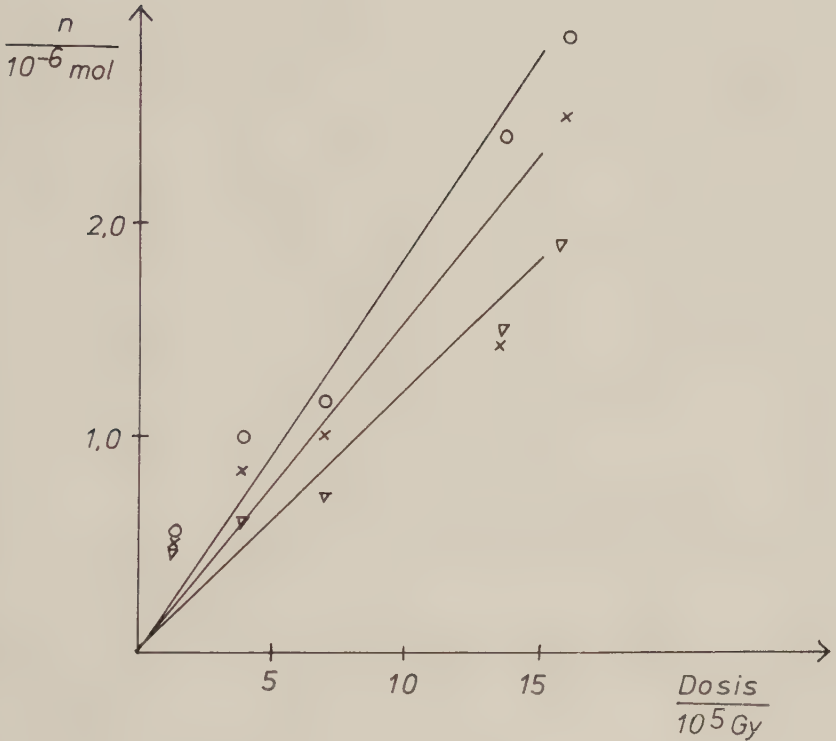


Abb. A 3: Dosisabhängigkeit der Basenabspaltung bei der Bestrahlung von DNA / H₂O : 33% / 67% im Vakuum bei 0°C, bezogen auf 100 mg trockene DNA. Dosisleistung : 9 Gy s⁻¹.

x Thymin

v Cytosin

o Adenin

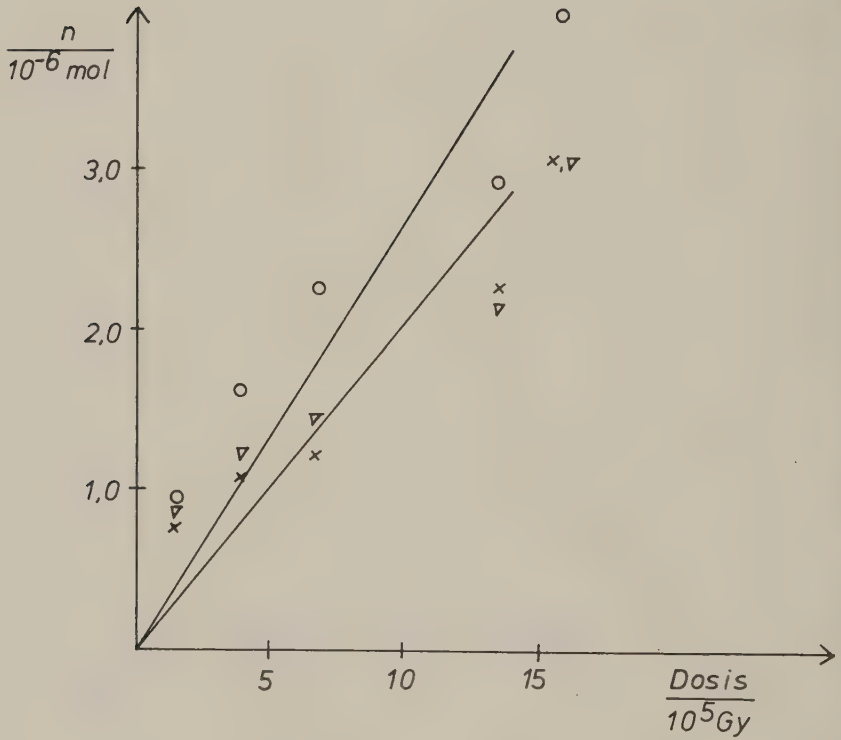


Abb. A 4: Dosisabhängigkeit der Basenabspaltung bei der Bestrahlung von DNA / H₂O : 17% / 83% im Vakuum bei 0°C, bezogen auf 100 mg trockene DNA. Dosisleistung: 9 Gy s⁻¹.

- x Thymin
- ▽ Cytosin
- Adenin

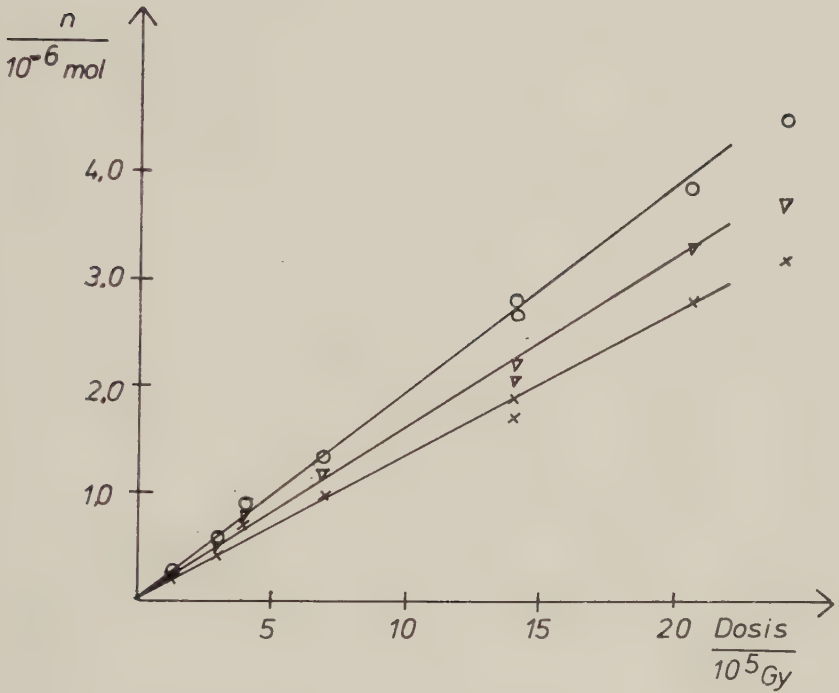


Abb. A 5: Dosisabhängigkeit der Basenabspaltung bei der Bestrahlung von trockener DNA unter Sauerstoff bei 0°C , bezogen auf 100 mg trockene DNA.

Dosisleistung : 9 Gy s^{-1} .

× Thymin

▽ Cytosin

○ Adenin

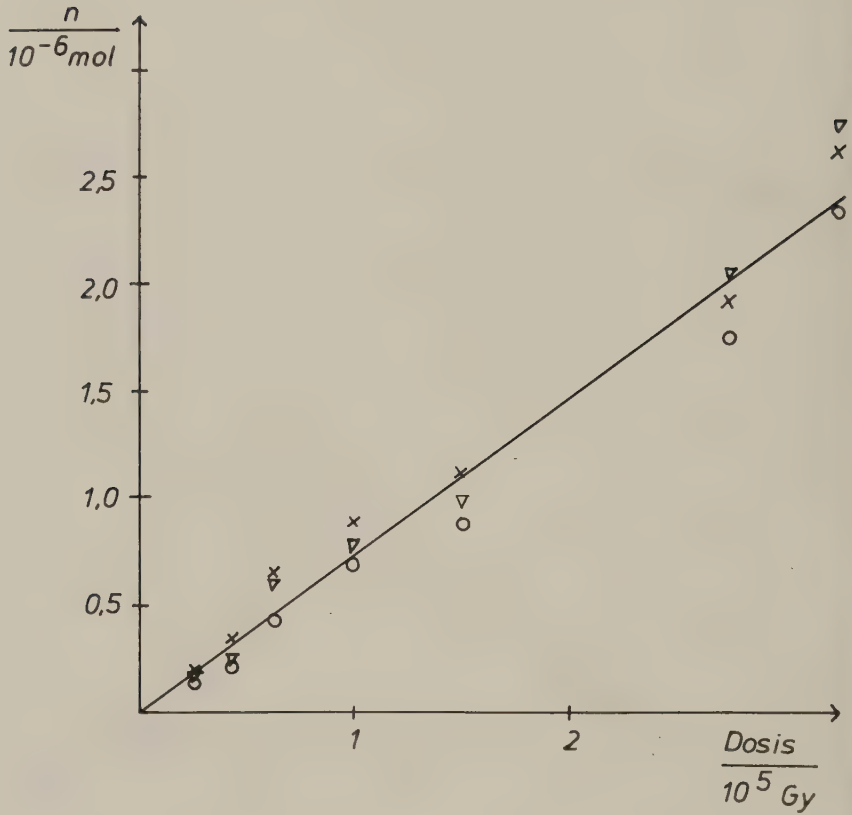


Abb. A 6: Dosisabhängigkeit der Basenabspaltung bei der Bestrahlung von DNA / H₂O : 33% / 67% unter Sauerstoff bei 0°C, bezogen auf 100 mg trockene DNA. Dosisleistung: 9 Gy s⁻¹.

x Thymin

v Cytosin

o Adenin

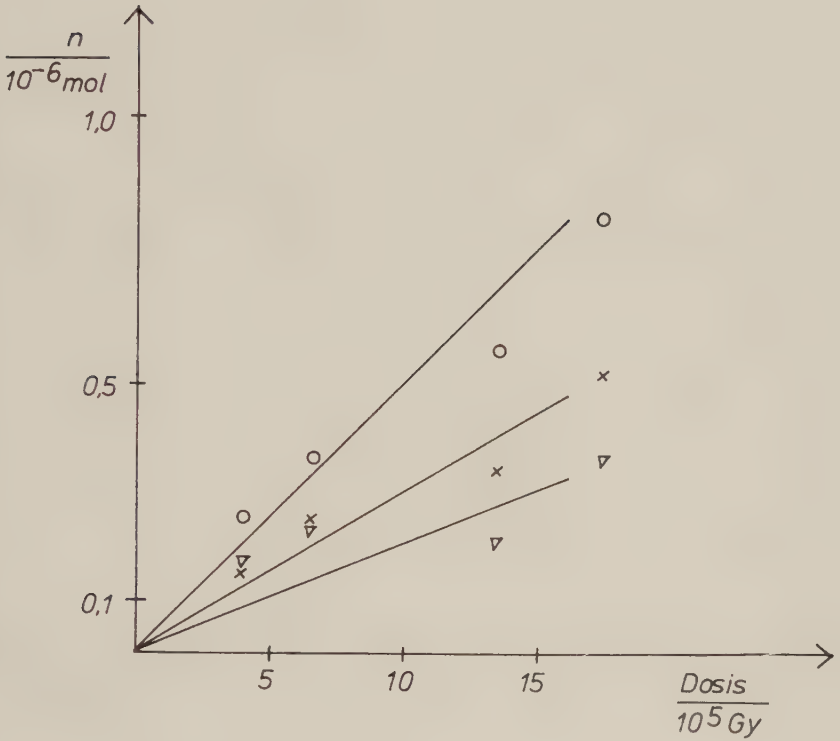


Abb. A 7: Dosisabhängigkeit der Basenabspaltung bei der Bestrahlung von DNA / H_2O / MeOH : 36% / 36% / 28% bei 0°C im Vakuum, bezogen auf 100 mg trockene DNA. Dosisleistung: 9 Gy s^{-1} .

- x Thymin
- v Cytosin
- o Adenin

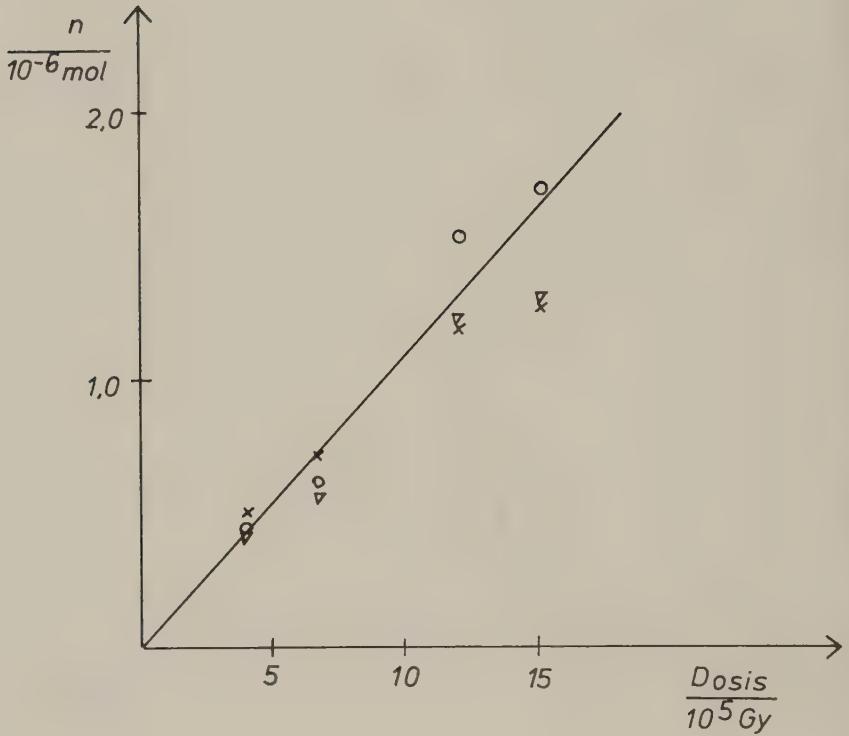


Abb. A 8: Dosisabhängigkeit der Basenabspaltung bei der Bestrahlung von DNA / H_2O / MeOH : 36% / 36% / 28% bei 0°C unter Sauerstoff, bezogen auf 100 mg trockene DNA. Dosisleistung: 9 Gy s^{-1} .

- x Thymine
- v Cytosine
- o Adenine

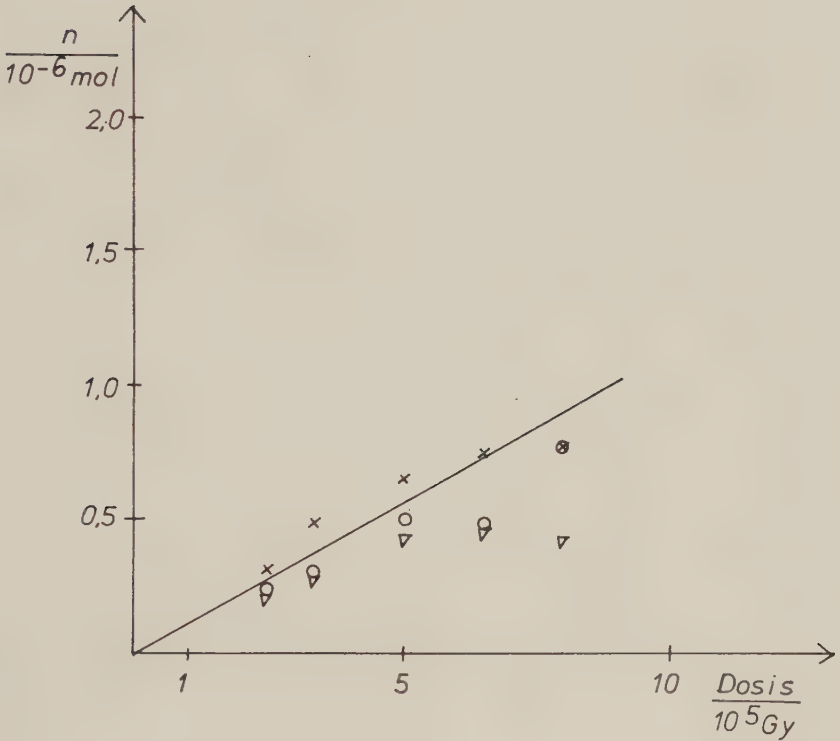


Abb. A 9: Dosisabhängigkeit der Basenabspaltung bei der Bestrahlung von DNA / H_2O / t-BuOH : 36% / 36% / 28% bei 0°C im Vakuum, bezogen auf 100 mg trockene DNA. Dosisleistung: 9 Gy s^{-1} .

- x Thymin
- v Cytosin
- o Adenin

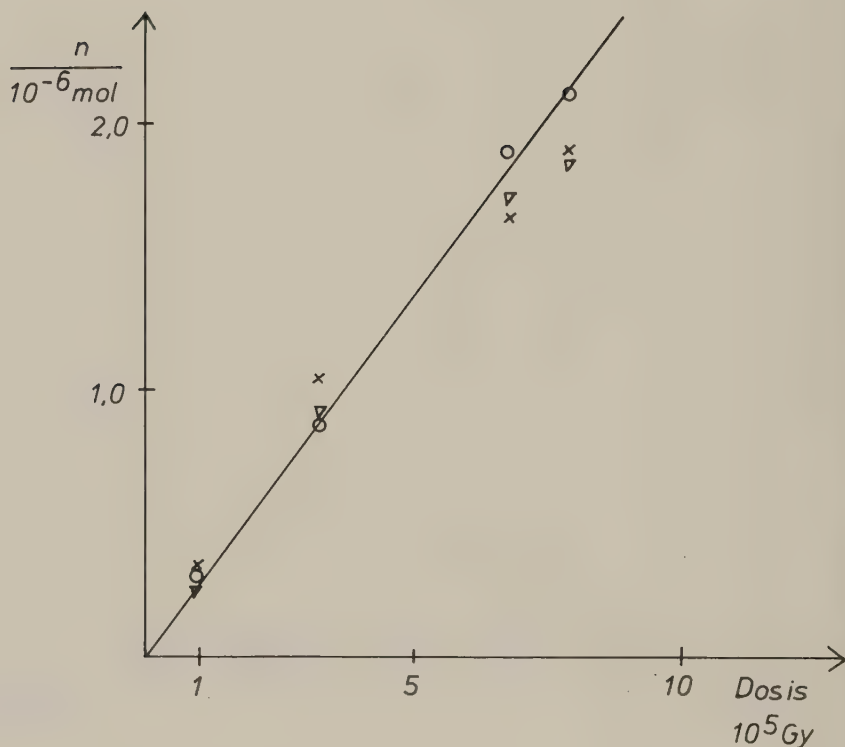


Abb. A 10: Dosisabhängigkeit der Basenabspaltung bei der Bestrahlung von DNA / H_2O / t-BuOH : 36% / 36% / 28% unter Sauerstoff bei 0°C , bezogen auf 100 mg trockene DNA. Dosisleistung: 9 Gy s^{-1} .

x Thymin

v Cytosin

o Adenin

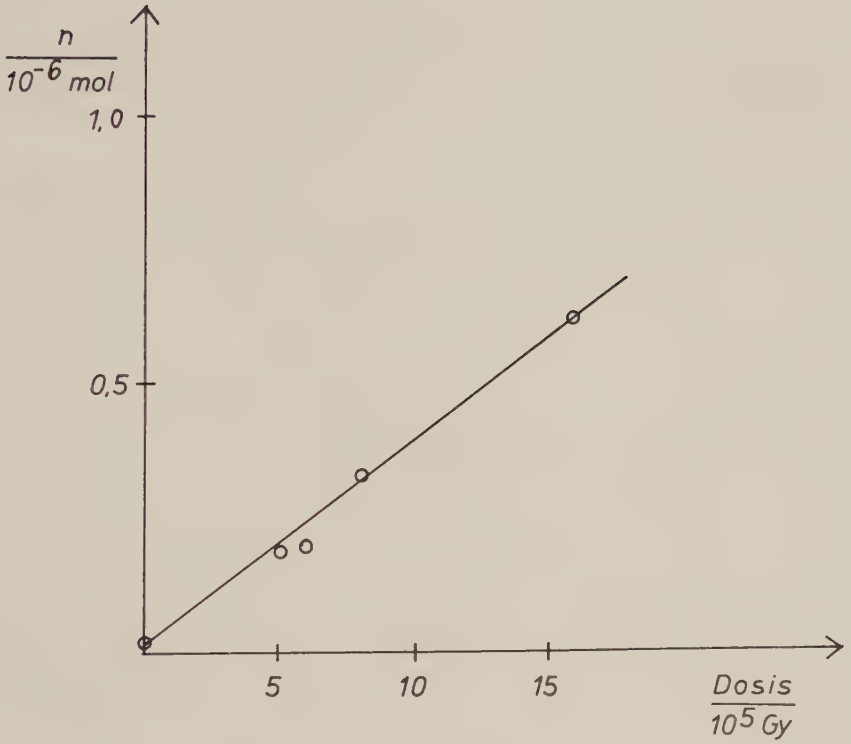


Abb. A 11: Dosisabhängigkeit der Basenabspaltung bei der Bestrahlung von Zellkernen als Pellet im Vakuum bei 0°C , bezogen auf 33,93 mg trockene Nukleinsäuren. Dosisleistung: 9 Gy s^{-1}

○ Adenin

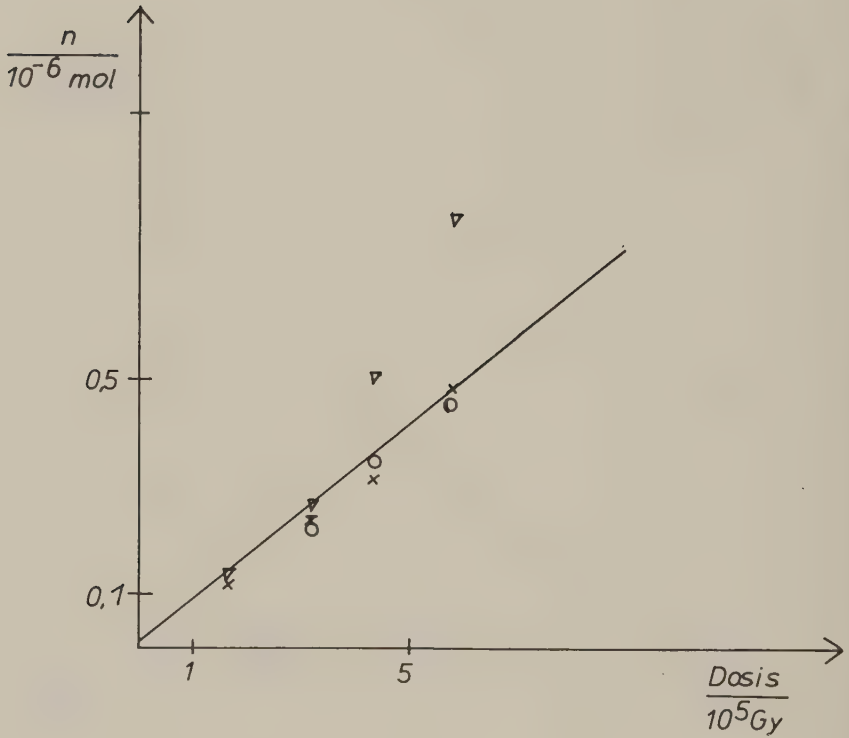


Abb. A 12: Dosisabhängigkeit der Basenabspaltung bei der Bestrahlung von Zellkernen als Pellet bei 0°C unter Sauerstoff, bezogen auf 33,93 mg trockene Nukleinsäuren. Dosisleistung: 9 Gy s^{-1}

x Thymin

∇ Cytosin

o Adenin

VIII LITERATURVERZEICHNIS

1. J. Kiefer,
"Biologische Strahlenwirkung",
Springer, Berlin, Heidelberg, New York (1981)
2. H.J. Rehm,
"Einführung in die industrielle Mikrobiologie", S.92,
Springer, Berlin, Heidelberg, New York (1971)
3. J. Schormüller,
"Lehrbuch der Lebensmittelchemie", 2. Aufl., S.288,
Springer, Berlin, Heidelberg, New York (1974)
4. J. Blok und H. Loman,
Curr. Top. Radiat. Res. Quart. 9, 165 (1973)
5. H.B. Michaels und J.W. Hunt,
Radiat. Res. 74, 23 (1978)
6. A. Henglein, W. Schnabel und J. Wendenburg,
"Einführung in die Strahlenchemie",
Verlag Chemie, Weinheim (1969)
7. I.G. Draganić und Z.D. Draganić,
"The Radiation Chemistry of Water",
Academic Press, New York, London (1971)

8. H.A. Schwarz,
J. Phys. Chem. 73, 1928 (1969)
9. H.A. Schwarz,
Adv. Radiat. Biol. 1, 1 (1964)
10. N.K. Kochetkov, L.I. Kudrjashov und M.A. Chlenov,
"Radiation Chemistry of Carbohydrates",
Pergamon Press, Oxford (1979)
11. R.H. Schuler, A.L. Hartzell und B. Behar,
J. Phys. Chem. 85, 192 (1981)
12. "Effects of Ionizing Radiation on DNA",
(A.J. Bertinchamps, J. Hüttermann, W. Köhnlein und
R. Téoule, Hrsg.),
Springer, Berlin, Heidelberg, New York (1978)
13. R. Téoule und J. Cadet,
J. Chem. Soc. D, Chem. Commun. 1971, 1269
14. A. Bonicel, N. Mariaggi, E. Hughes und R. Téoule,
Radiat. Res. 83, 19 (1980)
15. D.K. Hazra, S. Steenken,
im Druck
16. J.F. Ward,
Adv. Radiat. Biol. 5, 181 (1975)

17. H.P. Leenhouts und K.H. Chadwick,
Adv. Radiat. Biol. 7, 55 (1978)

18. C. von Sonntag und D. Schulte-Frohlinde, in
"Effects of Ionizing Radiation on DNA",
(A.J. Bertinchamps, J. Hüttermann, W. Köhnlein und
R. Téoule, Hrsg.), S. 204
Springer, Berlin, Heidelberg, New York (1978)

19. D. Schulte-Frohlinde,
Radiation Research Proc. 6th Int. Congr. Radiat. Res.,
(S. Okada et al., Hrsg.), S. 408,
Tokyo (1979)

20. C. von Sonntag, U. Hagen , A. Schön-Bopp und
D. Schulte-Frohlinde,
Adv. Radiat. Biol. 9, 109 (1981)

21. G. Scholes, R.L. Willson und M. Ebert,
J. Chem. Soc. D, Chem. Commun. 1969, 17

22. M.N. Schuchmann und C. von Sonntag,
J. Chem.Soc. Perkin II, 1977, 1958

23. M. Dizdaroglu, C. von Sonntag und D. Schulte-
Frohlinde,
J. Amer. Chem. Soc. 97, 2277 (1975)

24. F. Beesk, M. Dizdaroglu, D. Schulte-Frohlinde und
C. von Sonntag,
Int. J. Radiat. Biol. 36, 565 (1979)
25. M. Dizdaroglu, D. Schulte-Frohlinde und C. von
Sonntag,
Z. Naturforsch. 30c, 826 (1975)
26. M. Isildar, M.N. Schuchmann, D. Schulte-Frohlinde
und C. von Sonntag,
Int. J. Radiat. Biol. 40, 347 (1981)
27. M. Dizdaroglu, D. Schulte-Frohlinde und C. von
Sonntag,
Int. J. Radiat. Biol. 32, 481 (1977)
28. M. Dizdaroglu, D. Schulte-Frohlinde und C. von
Sonntag,
Z. Naturforsch. 32c, 1021 (1977)
29. G. Behrens, G. Koltzenburg und D. Schulte-Frohlinde,
Z. Naturforsch. 37c (1982), im Druck
30. G. Behrens, G. Koltzenburg, A. Ritter und
D. Schulte-Frohlinde,
Int. J. Radiat. Biol. 33, 163 (1978)

31. G. Ebert,
"Biopolymere", UTB
Dr. Dietrich Steinkopff Verlag, Darmstadt (1980)
32. A. Gräslund, A. Ehrenberg, A. Rupprecht, B.
Tjälldin und G. Ström,
Radiat. Res. 61, 488 (1975)
33. U. Hagen und H. Wellstein,
Strahlentherapie 128, 565 (1965)
34. C. Lücke-Huhle, A. Braun und U. Hagen,
Z. Naturforsch. 25b, 1264 (1970)
35. B. Kessler, A. Bopp und U. Hagen,
Int. J. Radiat. Biol. 20, 75 (1971)
36. G.J. Neary, V.F.W. Simpson-Gildemeister und A.R.
Peacocke,
Int. J. Radiat. Biol. 18, 25 (1970)
37. P. Alexander und J.T. Lett,
Nature (London) 187, 933 (1960)
38. J.T. Lett , K.A. Stacey und P. Alexander,
Radiat. Res. 14, 349 (1961)
39. P. Alexander, J.T. Lett, P. Kopp und R. Itzhaki,
Radiat. Res. 14, 363 (1961)

40. J.T. Lett und P. Alexander,
Radiat. Res. 15, 159 (1961)

41. W.A. Bernhard,
Adv. Radiat. Biol. 9, 199 (1981)

42. L.K. Mee und S.J. Adelstein,
Int. J. Radiat. Biol. 36, 359 (1979)

43. L.K. Mee, S.J. Adelstein und G. Stein,
Int. J. Radiat. Biol. 33, 443 (1978)

44. D.S. Kapp und K.C. Smith,
Radiat. Res. 42, 34 (1970)

45. L. Bohne, T. Coquerelle und U. Hagen,
Int. J. Radiat. Biol. 17, 205 (1970)

46. R.A. McGrath und R.W. Williams,
Nature (London) 212, 534 (1966)

47. C.J. Dean, M.G. Ormerod, R.W. Serianni und P.
Alexander,
Nature (London) 222, 1042 (1969)

48. S. Sawada und S. Okada,
Radiat. Res. 41, 145 (1970)

49. M.V.M. Lafleur, J. Woldhuis und H. Loman,
Int. J. Radiat. Biol. 36, 241 (1979)
50. M.V.M. Lafleur, J. Woldhuis und H. Loman,
Int. J. Radiat. Biol. 39, 113 (1981)
51. R. Roots und S. Okada,
Int. J. Radiat. Biol. 21, 329 (1972)
52. S. Sawada und S. Okada,
Radiat. Res. 44, 116 (1970)
53. D.M. Ginsberg und H.K. Webster,
Radiat. Res. 39, 421 (1969)
54. J.F. Ward und I. Kuo,
Int. J. Radiat. Biol. 18, 381 (1970)
55. M. Lennartz, T. Coquerelle, A. Bopp und U. Hagen,
Int. J. Radiat. Biol. 27, 577 (1975)
56. T. Coquerelle, A. Bopp, B. Kessler und U. Hagen,
Int. J. Radiat. Biol. 24, 379 (1973)
57. R. Roots und K.C. Smith,
Int. J. Radiat. Biol. 26, 467 (1974)

58. B. Palcic und L.D. Skarsgard,
Int. J. Radiat. Biol. 21, 417 (1972)
59. G. Hems,
Nature (London) 186, 710 (1960)
60. M. Ullrich und U. Hagen,
Int. J. Radiat. Biol. 19, 507 (1971)
61. J.F. Ward und I. Kuo,
Radiat. Res. 66, 485 (1976)
62. R.C. Richmond und A.D. Kelman,
Radiat. Res. 88, 476 (1981)
63. M. Simon,
Int. J. Radiat. Biol. 16, 167 (1969)
64. R. Téoule, A. Bonicel, C. Bert, J. Cadet und
M. Polverelli,
Radiat. Res. 57, 46 (1974)
65. G.W. Rushizky, E.M. Bartos und H. Sober,
Biochemistry 3, 626 (1964)
66. J.N. Davidson,
"The Biochemistry of the Nucleic Acids", 8th Ed.
Chapman a. Hall, London (1976)

67. E. Sidebottom, in
"The Cell Nucleus", (H. Busch, Hrsg.), 1, 450,
Academic Press, New York, London (1976)
68. V. Seligy und M. Miyagi,
Exptl. Cell Res. 58, 27 (1969)
69. H. Zentgraf, B. Deumling, E.-D. Jarasch und W.W.
Franke,
J. Biol. Chem. 246, 2986 (1971)
70. N. Ringertz und L. Bolund, in
"The Cell Nucleus", (H. Busch, Hrsg.), 3, 417,
Academic Press, New York, London (1974)
71. E. Chargaff, in
"The Nucleic Acids", (J.N. Davidson, Hrsg.), 1, 307,
Academic Press, New York (1955)
72. J.A. McCloskey, in
"Basic Principles in Nucleic Acid Chemistry",
(P.O.P. Ts'o, Hrsg.), Vol I, 243,
Academic Press, New York, London (1974)
73. S.D. Dover, in
"An Introduction to Physical Properties of Large
Molecules in Solution", (E.G. Richards, Hrsg.),
IUPAB Biophysics Series, Cambridge University Press,
Cambridge (1980)

74. A.I. Krasna, J.R. Dawson und J.A. Harpst,
Biopolymers 9, 1017 (1970)
75. A.I. Krasna,
Biopolymers 9, 1029 (1970)
76. U.K. Ehmann und J.T. Lett,
Radiat. Res. 54, 152 (1973)
77. N.P. Krushinskaya und M.I. Shal'nov,
Radiobiology 7, 36 (1967)
78. L. Giloni, M. Takeshita, F. Johnson, C. Iden und
A.P. Grollmann,
J. Biol. Chem. 256, 8606 (1981)
79. R.M. Burger, A.R. Berkowitz, J. Peisach und S.B.
Horwitz,
J. Biol. Chem. 255, 11832 (1980)
80. Dissertation, H. Geldermann,
Ruhr-Universität Bochum (voraussichtlich Februar '83)
81. R.C. Richmond und J.D. Zimbrick,
Biochem. Biophys. Res. Commun. 64, 391 (1975)
82. S.E. Bresler, L.A. Noskin, N.A. Kuzovleva und
I.G. Noskina,
Int. J. Radiat. Biol. 36, 289 (1979)

83. I.C. Caldwell,
J. Chromatogr. 44, 331 (1969)
84. Diplomarbeit, I. Krönke,
Ruhr-Universität Bochum (April 1980)
85. H. Fricke und E.J. Hart, in
"Radiation Dosimetry", (F.H. Attix, W.C. Roesch
und E. Tochilin, Hrsg.), 2nd Ed., Vol II, 167,
Academic Press, New York, London (1966)
86. G.V. Talpin, in
"Radiation Dosimetry", (G.J. Hine und G.L. Brownell,
Hrsg.), S. 358, Academic Press, New York (1956)
87. H. Bauer und N. Getoff, in
"Strahlenchemie", (K. Kaindl und E.H. Graul, Hrsg.),
S. 226, Dr. Alfred Hüthing Verlag, Heidelberg (1967)
88. M. Dole,
"The Radiation Chemistry of Macromolecules", Vol I,
266, Academic Press, New York, London (1972)
89. W. Ebeling, N. Hennrich, M. Klockow, H. Metz, H.D.
Orth und H. Lang,
Eur. J. Biochem. 47, 91 (1974)

90. M. Gross-Bellard, P. Oudet und P. Chambon,
Eur. J. Biochem. 36, 32 (1973)
91. D.L. Stalling, C.W. Gehrke und R.W. Zumwalt,
Biochem. Biophys. Res. Commun. 31, 616 (1968)
92. G. Schomburg und H. Husmann,
Chromatographia 8, 517 (1975)
93. G. Schomburg, H. Husmann und F. Weeke,
J. Chromatogr. 99, 63 (1974)
94. J.B.T. Aten und J.A. Cohen,
J. Mol. Biol. 12, 537 (1965)
95. J.A. Harpst, A.I. Krasna und B.H. Zimm,
Biopolymers 6, 595 (1968)
96. H. Scherz, G. Stehlik, E. Baucher und K. Kaindl,
Microchim. Acta, 916 (1967)
97. V.S. Waravdekar und L.D. Saslaw,
J. Biol. Chem. 234, 1945 (1959)
98. R.F. Schleif und P.C. Wensink,
"Practical Methods in Molecular Biology", S. 96,
Springer, New York, Heidelberg, Berlin (1981)

99. M. Falk, K.A. Hartman, Jr. und R.C. Lord,
J. Amer. Chem. Soc. 85, 387 (1963)
100. L.S. Myers, Jr. in
"The Radiation Chemistry of Macromolecules",
(M. Dole, Hrsg.), Vol II, 323
Academic Press, New York, London (1973)
101. O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr und R.J.
Randall,
J. Biol. Chem. 193, 265 (1951)
102. D. Schulte-Frohlinde, Vortrag auf der Konferenz:
"First Conference of Radioprotection and Anti-
carcinogenes", 21. - 24.6.82 in Gaethersburg,
Maryland, USA

Lebenslauf

7. Juni 1953 geboren in Frankfurt a. M., als Tochter
des Dipl.-Kfm. Dr. Heinrich Krönke und
seiner Ehefrau Herta, geb. Trummel
seit 1955 wohnhaft in Kettwig/Ruhr

Schulausbildung

1959 - 1963 Volksschule in Kettwig
1963 - 1971 Theodor-Heuss-Gymnasium Kettwig
Abschluß: Abitur

Studium

Okt. 1971 Immatrikulation an der Westfälischen
Wilhelms-Universität Münster
Fachrichtung: Lebensmittelchemie
April 1975 Vorexamen
Mai 1976 - Jan. 1977 Praktikum im Chemischen Untersuchungs-
amt der Stadt Essen
Juli 1977 Abschluß des Studiums mit dem Staats-
examen für Lebensmittelchemiker
Okt. 1978 Immatrikulation an der Ruhr-Univer-
sität Bochum

Institutstätigkeit

Feb. 1978-Jan. 1980 Stipendiatin am Max-Planck-Institut
für Strahlenchemie, Mülheim a.d. Ruhr
Okt. 1979-April 1980 Diplomarbeit gemäß § 4 (3) der
Promotionsordnung
April 1980-Dez. 1982 wissenschaftliche Mitarbeiterin,
Anfertigung der Dissertation

